

***CANDIDA PARAPSILOSIS* SZEKRETÁLT ASZPARTIL PROTEINÁZOK VIRULENCIÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

HORVÁTH PÉTER FERENC

**TÉMAVEZETŐ:
DR. GÁCSER ATTILA
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. Klinikailag jelentős opportunistá humán patogén <i>Candida</i> fajok	9
3.2. A <i>Candida parapsilosis</i> általános jellemzése	10
3.3. Szekretált aszpartil proteinázok	15
3.4. Gén deléciós és over-expressziós módszerek <i>Candida</i> fajokban	23
4. CÉLKITŰZÉSEK	32
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
5.1. A munkánk során felhasznált mikrobák, előállított deléciós mutáns törzsek és felhasznált primerek	33
5.2. <i>Candida</i> transzformációhoz és Southern hibridizációhoz használt reagensek	36
5.3. Gateway reakcióhoz használt reagensek	37
5.7. Tenyésztéshez használt táptalajok, tápoldatok	38
5.8. Tenyésztési körülmények	40
5.9. Primer sejtek izolálása	40
5.10. Kompetens sejtek készítése	40
5.11. Kompetens sejtek transzformálása	41
5.12. Vektorok létrehozása	43
5.13. Gateway reakciók	44
5.14. Bakteriális plazmid, gomba genomi DNS és gomba RNS tisztítása	45
5.15. Proteináz aktivitás mérése	48
5.16. Virulencia vizsgálatok	49
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÜK	55
6.1. A <i>C. parapsilosis</i> Sapp1 fehérjének, valamint a szekretált aszpartil proteinázok általános szerepének virulenciában betöltött vizsgálata	55
6.1.1. A <i>C. parapsilosis</i> SAPP1 lokuszának <i>in silico</i> analízise	55
6.1.2. A Δ/Δ sapp1a, Δ/Δ sapp1b és a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b homozigóta deléciós mutánsok létrehozása	55
6.1.3. A <i>C. parapsilosis</i> Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 deléciós törzs előállítása	58
6.1.4. A szekretált aszpartil proteináz gének kvantitatív <i>in vitro</i> transzkripciójának vizsgálata	59
6.1.5. Az extracelluláris proteináz aktivitás vizsgálata	61
6.1.6. A Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitások kvantitatív vizsgálata	63
6.1.7. A vad típusú és a deléciós törzsek szérumérzékenységeinek vizsgálata	65
6.1.8. A vad típusú és mutáns törzsek fagocitózisának vizsgálata	67
6.1.9. A perifériális mononukleáris sejtek (PBMC) és abból differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM) gombaölési hatékonysága	70
6.1.10. A gazda sejtek károsodásának mérése	72
6.1.11. Humán PBMC-DM sejtek vad típusú és Sapp negatív törzsekkel való fertőzésre adott immunválasza	74
6.1.12. Nagy viaszmolý (<i>Galleria mellonella</i>) lárvák túlélésének <i>in vivo</i> vizsgálata	75
6.1.13. A <i>C. parapsilosis</i> vad típusú, Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek sejtfalösszetételének vizsgálata	76
6.2. Egy lehetséges overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása <i>C. parapsilosis</i> -ban	80
6.2.1. <i>C. parapsilosis</i> overexpresszióra alkalmas fogadó törzsének létrehozása.	81

6.2.2. Az elkészített <i>C. parapsilosis</i> fogadó törzs GFP transzformációja	82
6.2.3. Az első overexpressziós vektor létrehozása	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	86
7.1. A <i>C. parapsilosis</i> szekretált aszpartil proteináz 1 (Sapp1) virulenciában betöltött szerepének vizsgálata.....	87
7.2. A <i>C. parapsilosis</i> „Sapp negatív” szekretált aszpartil proteinázt nem termelő mutáns törzsének virulencia vizsgálata.	89
7.3. <i>C. parapsilosis</i> overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása.	92
8. SUMMARY	95
8.1. The role of secreted aspartyl proteinase 1 (Sapp1) in host-pathogen interactions.	96
8.2. The general role of <i>C. parapsilosis</i> secreted proteinases in virulence and host-pathogen interactions.	98
8.3. Development of an overexpression strategy for <i>C. parapsilosis</i>	100
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	102
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<i>ACT1</i>	<u>A</u> ctine <u>1</u> – Aktin 1
ANOVA	<u>A</u> nalysis of <u>V</u> ariance Between Groups – Csoportok közti variancia analízis
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine – Borjú szérum albumin
<i>caFLP</i>	<u>C</u> andida <u>a</u> lbicans optimized <u>F</u> lippase – <i>C. albicans</i> -ra optimalizált flippáz
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CDC	<u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and Prevention
ConA	<u>C</u> oncavalin <u>A</u> – Konkavalin A
<i>CDR1</i>	<u>C</u> andida <u>D</u> rug <u>R</u> esistance Gene <u>1</u> – <i>Candida</i> drogrezisztencia gén 1
CFU	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit – Kolóniaképző egység
<i>CPH1</i>	<u>C</u> andida <u>P</u> seudohyphal Regulator <u>1</u> – <i>Candida</i> pseudohifa regulátor 1
<i>CpLIP</i>	<u>C</u> andida <u>p</u> arapsilosis <u>L</u> ipase – <i>C. parapsilosis</i> lipáz
Cpp1	<u>C</u> andida <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase – Candida protein foszfátáz
DIG	<u>D</u> igoxigenine - Digoxigenin
DTT	<u>D</u> ithio <u>T</u> hreitol – Ditiotritol
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamin <u>T</u> etra <u>A</u> cetic acid – Etilén-diamin-tetraecetsav
Efg1	<u>E</u> nhanced <u>f</u> ilamentous growth – Megnövekedett fonalas növekedés
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay – Enzimkötött immunoszorbens próba
FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter – Fluoreszcencia aktivált sejtseparator
<i>FAS2</i>	<u>F</u> atty <u>A</u> cid <u>S</u> ynthase type <u>2</u> – Kettes típusú zsírsav szintáz
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum – Embrionális borjúsérum
<i>FIT2</i>	<u>F</u> at Storage- <u>I</u> nducing Protein <u>T</u> ype <u>2</u> – Kettes típusú zsír tárolást elősegítő protein
FITC	<u>F</u> icoerythrine <u>I</u> sothiocyanate – Fikoeritrin izotiocianát
FLP	<u>F</u> lippase – Flippáz
FRT	<u>F</u> LP <u>R</u> ecombination <u>T</u> arget – FLP rekombinációs célszekvencia
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein – Zöld fluoreszcens protein
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>M</u> onocyte <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor – Granulocita-monocita kolóniastimuláló faktor
GPI	<u>G</u> lycosyl <u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol – Glikozil-foszfatidil-inozitol
GTW	Gateway
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus – Humán immunodeficiencia vírus

<i>hph</i>	hygromycin B rezisztencia marker
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography – Nagyfelbontású folyadékkromatográfia
IgA	<u>I</u> mmunglobulin <u>A</u>
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL-1 β	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>1</u> β
IL-6	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>6</u>
IMH3	<u>I</u> nosine <u>M</u> onophosphate De <u>h</u> ydrogenase <u>3</u> – Inozin-monofoszfát-dehidrogenáz 3
Kex2	<u>K</u> exin <u>2</u> (Subtilizin-like protease) – Kexin 2 (szubtilizin-szerű proteináz)
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani tápoldat
LDH	<u>L</u> actate De <u>h</u> ydrogenase - Laktát dehidrogenáz
<i>LIP</i>	<u>L</u> ipase - Lipáz
mdr1	<u>M</u> ultidrug Efflux Pump <u>1</u> - Egyes típusú drog efflux pumpa
MRSA	<u>M</u> ethicillin/oxacillin <u>R</u> esistant <i>Staphylococcus aureus</i> – Methicillin/oxacillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
NAT	Nourseothrycine - Nourseothricin
<i>OLE1</i>	Stearoyl –coenzyme A desaturase 1 – Sztearoil koenzim A deszaturáz 1
PBMC	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ell – Perifériális vér mononukleáris sejt
PBMC-DM	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ell <u>D</u> erived <u>M</u> acrophage - Perifériális vér mononukleáris sejtől differenciáltatott makrofág
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline - Foszfátpuffer
PE	<u>P</u> hycoerithrine - Fikoeritrin
<i>PGK</i>	<u>P</u> hosphoglycerate <u>K</u> inase – Foszfoglicerát kináz
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) – Piperazin-N,N'-bisz(2-etánszulfonsav)
PS	<u>P</u> enicillin- <u>S</u> treptomycin – Penicillin-sztreptomicin
Ptet	<u>P</u> romoter of <u>T</u> etracycline – Tetraciklin promóter
qRT-PCR	<u>Q</u> uantitative <u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> CR – Kvantitatív valós idejű PCR
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphysm – Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
RNáz	Ribonukleáz
<i>RP10</i>	<u>R</u> ibosomal <u>P</u> rotein <u>10</u> of the 40S Subunit – 40S alegység riboszomális protein 10
Rpm	<u>R</u> otation per <u>m</u> inute – Fordulat per perc
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute

Sap	<u>S</u> ecreted <u>A</u> spartyl <u>P</u> roteinase – Szekretált aszpartil proteináz
Sapcd	<u>S</u> ecreted <u>A</u> spartyl <u>P</u> roteinase <u>C</u> andida <u>d</u> ubliniensis – <i>C. dubliniensis</i> szekretált aszpartil proteináz
Sapp	<u>S</u> ecreted <u>A</u> spartyl <u>P</u> roteinase <u>C</u> andida <u>p</u> arapsilosis – <i>C. parapsilosis</i> szekretált aszpartil proteináz
Sapt	<u>S</u> ecreted <u>A</u> spartyl <u>P</u> roteinase <u>C</u> andida <u>t</u> ropicalis – <i>C. tropicalis</i> szekretált aszpartil proteináz
SAT1	<u>S</u> treptothrycine <u>A</u> cetyl <u>t</u> ransferase <u>1</u> – Szteptotricin acetiltranszferáz 1
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulphate – Nátrium-dodecil-szulfát
SOB	<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal <u>B</u> roth
SSC	<u>S</u> aline- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate buffer – Nátrium-klorid – Nátrium-citrát puffer
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA buffer – Tris-EDTA puffer
TEC1	TEA/ATTS domain Transcriptional Factor 1 – TEA/ATTS domén transzkripció faktor 1
TEF1	<u>T</u> ranscription <u>E</u> longation <u>F</u> actor <u>1</u> - <u>T</u> ranszkripció <u>E</u> longációs <u>F</u> aktor <u>1</u>
TEF2	<u>T</u> ranscription <u>E</u> longation <u>F</u> actor <u>2</u> - <u>T</u> ranszkripció <u>E</u> longációs <u>F</u> aktor <u>2</u>
TetO	<u>T</u> etracycline <u>O</u> perator – Tetraciklin operátor
TetR	<u>T</u> etracycline <u>R</u> esistance transactivator - <u>T</u> etraciklin <u>r</u> ezisztencia transzaktivátor
TFA	<u>T</u> ri <u>f</u> luor <u>A</u> cetic <u>A</u> cid – Trifluor-ecetsav
TNF α	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor α – Tumor nekrózis faktor α
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethane - Tris-(hidroximetil)-aminometán
WGA	<u>W</u> heat <u>G</u> erm <u>A</u> gglutinin – Búzacsíra agglutinin
WOR1	<u>W</u> hite- <u>O</u> paque Transcriptional <u>R</u> egulator <u>1</u> – White-opaque transzkripció regulátor 1
WT	<u>W</u> ild <u>T</u> ype - vadtípus
Yap	<u>Y</u> east <u>A</u> spartyl <u>P</u> roteinase – élesztő aszpartil proteináz
YCB	<u>Y</u> east <u>C</u> arbon <u>B</u> ase – élesztő szénbázis
YNB	<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase – élesztő nitrogénbázis
YPD	<u>Y</u> east extract <u>P</u> eptone <u>D</u> extrose – élesztőkivonat pepton dextróz
Yps	<u>Y</u> apsin - Yapszin

2. BEVEZETÉS

Az elmúlt három évtized során az opportunisták humán patogén gombák által kiváltott fertőzések száma jelentős mértékben megemelkedett. Bár jelenlegi ismereteink szerint a környezetből izolálható ismert mikroszkopikus gombák száma meghaladja a százezret, mégis a humán megbetegedésekért csupán néhány tíz tehető felelőssé. A mikózisok leggyakoribb okozói az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fonalas gombák (pl. *A. fumigatus*), a *Cryptococcus neoformans*, valamint a *Candida* fajok. Ezen mikrobák által okozott megbetegedések változatosak lehetnek, bizonyos körülmények között enyhébb lefolyású, felszíni, más esetekben súlyosabb, akár halálos kimenetelű szisztémás fertőzések kiváltására képesek. Bár számos *Candida* faj a normál, humán mikroflóra tagja, mégis a nozokomiális, szisztémás fertőzések egyik leggyakoribb kiváltói. Felmérések szerint ezen élesztők átlagosan minden harmadik egészségügyi dolgozó kezén megtalálhatók. A felnőtt lakosság körében a szisztémás kandidiázis kialakulásáért legnagyobb százalékban (akár az esetek felében) a *Candida albicans* tehető felelőssé. Különösen veszélyeztetettek az elégtelen immunrendszerrel rendelkező, vagy szerv transzplantáción átesett betegek és a HIV fertőzöttek. Újszülöttek körében, a kandidiázisos esetekért felelős ágensek között a *C. parapsilosis* okozta megbetegedések száma sok esetben a *C. albicans* által okozott megbetegedések esetszámát is felülmúlja. Ennek egyik oka lehet, hogy a *C. parapsilosis* előzetes kolonizáció nélkül is képes megbetegedések kiváltására, az egészségügyi dolgozók kezéről, vagy nem steril klinikai eszközök segítségével juthat a kórházban tartózkodó újszülöttre. A veszélyeztetett célcsoport különbözősége a gazda-patogén kölcsönhatás eltérő mivoltára enged következtetni.

Mivel a kandidiázis leggyakoribb kiváltója a *C. albicans*, ezért kezdetben, mintegy három évtizeddel ezelőtt a molekuláris és genetikai vizsgálatok ezzel a fajjal kezdődtek meg. A mikroba virulenciájának kialakulásában (mind *C. albicans*, mind *C. parapsilosis* esetén) fontos szerepet játszik a gazda felületén való megtapadás képessége. Azon fajok, amelyek a megtapadás után biofilm formálásra képesek, jóval virulensebbnek bizonyulnak, mint a biofilm képzésre képtelen fajok. *C. albicans* esetén jelentős virulencia faktor a hifa képzés képessége, amely a gazda szövetébe való behatolást segítheti elő. Ezzel ellentétben a *C. parapsilosis* valódi hifa képzésére nem, csupán pseudohifa képzésére képes. Mindkét mikroba esetén a virulencia kialakulásában fontos szerep jut a szekretált hidrolitikus enzimek termelésének. Ezek közül legfontosabb szerepük a szekretált lipázoknak, szekretált aszpartil proteinázoknak és kisebb mértékben a szekretált foszfolipázoknak van. *C. albicans*-ban – egészségügyi fontosságánál fogva – ezek a virulencia faktorok széles körben

tanulmányozottak, ellentétben a *C. parapsilosis*-sal. A legtöbb tanulmány, amely a *C. albicans* virulencia faktorait tanulmányozta, valamilyen, az adott virulencia faktorra homozigóta deléciós törzset használt fel. Bár *C. albicans* esetén számos, eredményesen működő géndeléciós módszert kidolgoztak, addig a géneket túlműködtető stratégiák kidolgozása jelenleg is folyamatban van. *C. parapsilosis* esetén a gén deléciós stratégiák száma jóval korlátozottabb, míg géneket túlműködtető stratégia ezidáig nem állt rendelkezésre ezen mikroba esetén. Annak érdekében, hogy a genetikai manipulációk repertoárját *C. parapsilosis* esetén gazdagítsuk, valamint az egyes gének funkciójának vizsgálatához új módszert biztosítsunk, munkánk során sikeresen kidolgoztunk egy géneket túlműködtető rendszert, amelynek segítségével azok a mutációk is tanulmányozhatóvá válnak, melyek a gén deléció során potenciálisan letális fenotípusúnak bizonyulnak.

Számos *C. albicans*-on végzett vizsgálat kimutatta ezen mikroba szekretált aszpartil proteináz izoenzimeinek, mint virulencia faktoroknak a szerepét a gazdával való interakció során. *C. albicans* esetén tíz szekretált aszpartil proteináz génből álló gén családot azonosítottak (*SAP1-SAP10*). Minden *SAP* gén kifejeződése szigorúan szabályozott. A kifejeződés függ a mikroba életciklusától (pl. élesztő – hifa átmenet), az esetleges fertőzés típusától, helyétől és annak előrehaladott állapotától. A fertőzés kezdeti stádiumában a szekretált aszpartil proteinázok képesek a gazda szöveti integritásának megbontására, így biztosítva a mikroba terjedését. Szisztémás kandidiázis kialakulása során a szekretált aszpartil proteinázok képesek számos strukturális és immunológiai fontos fehérje bontására, elősegítve ezzel a mikroba terjedését. A *C. albicans* Sap izoenzimeinek jelentőségét mutatja, hogy ezen szekretált enzimek felhasználásával a közelmúltban megkezdődött egy *C. albicans* elleni vakcina kidolgozása. Ezzel ellentétben *C. parapsilosis* esetén, bár az ismert szekretált aszpartil proteináz izoenzimek enzimológiai jellemzése megtörtént, a gazda – patogén interakció során betöltött szerepükről mindezidáig minimális ismeretek álltak rendelkezésünkre. A *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepének tanulmányozása érdekében munkánk során *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteináz génekre deléciós mutáns törzseket hoztunk létre. Az előállított deléciós mutánsok segítségével lehetőség nyílt a szekretált aszpartil proteinázok funkciójának, valamint virulenciában betöltött szerepük vizsgálatára, mind *in vitro*, mind *in vivo* modellrendszerek segítségével.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Klinikailag jelentős opportunistá humán patogén *Candida* fajok

Az elmúlt három évtized során az opportunistá humán patogén gombák által kiváltott invazív megbetegedések száma nagymértékben megnövekedett, így új antifungális stratégiák kidolgozása, az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia és a gazda – patogén kölcsönhatások alaposabb megértése napjainkra egyre sürgetőbbé vált (Pfaller és mtsai. 2007).

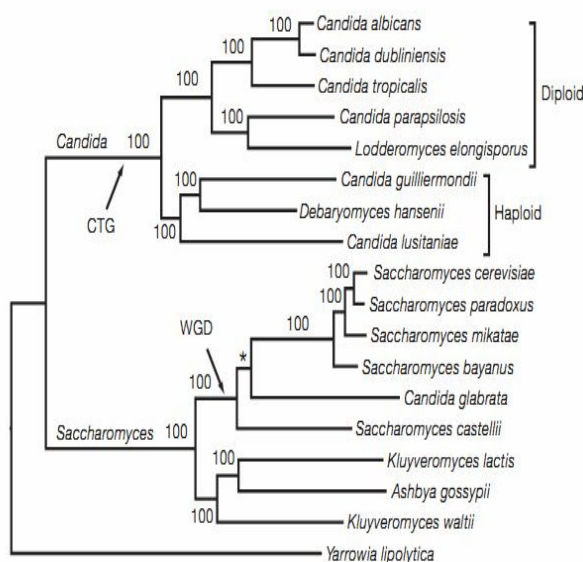
A normál humán mikroflóra felépítésében számos mikroba részt vesz. Születés után kialakul a mikrobák természetes egyensúlya. Erre a baktériumok dominanciája jellemző, de számos, az Ascomycota és Basidiomycota csoportba tartozó gombafaj is jelen van (Filippidi és mtsai. 2014). Egészséges egyénekben ezen fajok anélkül vannak jelen, hogy a gazdaszervezetben bármilyen kórfolyamatot kiváltanának. Opportunistá humán patogén gombák által kiváltott megbetegedések legtöbb esetben akkor következnek be, amikor a gazda által adott immunválasz valamely oknál fogva elégtelen (pl. szerv transzplantáció, HIV fertőzés) és a szervezet képtelen a megfelelő védekezésre, így ezen mikrobák fertőzések kialakítására képesek. Humán mikózisok kiváltásában legnagyobb részben *Aspergillus*, *Cryptococcus* és *Candida* fajok vesznek részt (Pfaller és mtsai. 2007).

Számos *Candida* faj mint a normál, humán mikroflóra alkotói vannak jelen a bőr, valamint a nyálkahártyák felszínén. Az elmúlt harminc év során a *Candida* fajok által okozott megbetegedések egyre növekvő tendenciát mutattak (Pfaller és Diekema 2007). Ezen fajok felszíni és invazív szisztémás fertőzéseket egyaránt kiválthatnak. Felszíni fertőzések során főként a köröm, bőr, valamint az ivarszervek érintettek. Szisztémás fertőzés során a mikroba a véráramba kerül, így a véráram közvetítésével a belső szervek megbetegedését is kiválthatja. Pfaller és Diekema tanulmánya szerint az Egyesült Államokban 100.000 főre vetítve átlagosan 29 esetet regisztráltak (Pfaller és Diekema 2007). Több tanulmány szerint a felnőtt lakosság körében a kandidiázis okozta mortalitási arány rendkívül magas, amely az összes kandidémiás eset akár 50%-át is megközelítheti (Pappas és mtsai. 2003, Moran és mtsai. 2009). A felnőtt lakosság körében a kandidiázis kiváltásáért főként a *C. albicans* felelős, ám az egyéb nem-*albicans* fajok(*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) által okozott megbetegedések növekvő tendenciát mutatnak az ezredforduló óta (Pfaller és mtsai. 2007, Papon és mtsai. 2013). Különböző korcsoportokat vizsgálva a kandidémiát kiváltó mikrobák részaránya eltérő. Fiatalabb korcsoportok, elsősorban csecsemők, újszülöttek körében a *C. parapsilosis* részaránya kiemelkedően magas (Trofa és mtsai. 2008, Chow és mtsai. 2012).

3.2. A *Candida parapsilosis* általános jellemzése

A mintegy 200 fajt magába foglaló CUG klád számos tagja a környezetből izolálható (Pereira és mtsai. 2013, Pryszcz és mtsai. 2013). Néhány tagjuk biotechnológiai jelentőséggel is bír (Dias és mtsai. 2000), míg a nemzetség döntő többsége magasabb rendű gazdaszervezettel él kommenzalista kapcsolatban. A kládra jellemző, hogy az univerzális kódhasználattól eltérően a transzláció folyamata során, CUG kodon esetében szerin beépülése valósul meg leucin helyett. (1. ábra) (Butler és mtsai. 2009).

A *C. parapsilosis*-t először Ashford izolálta 1928-ban Puerto Rico-ban, egy hasmenéses beteg székletéből. Az új fajt *Monilia parapsilosis*-ként írta le, megkülönböztetve az akkor már ismert és jóval nagyobb gyakorisággal izolált *Monilia psilosis* (mai nevén *C. albicans*) fajtól (Weems 1992).



1. ábra

A *C. parapsilosis* filogenetikai helyzete (Butler és mtsai. 2009).

A *C. parapsilosis* diploid organizmus, ezidáig csak ivartalan szaporodási ciklusa ismert, amely sarjadzással történik. Teljes genom szekvenciája 2009-ben vált elérhetővé (Butler és mtsai. 2009). A referenciaként használt CDC317 jelű törzs alapján haploid genommérete 13,1 Mb, génjeinek száma mintegy 5700 (Butler és mtsai. 2009). Korábban a *C. parapsilosis*-ként ismert faj három alcsoportot foglalt magában (I, II, III), melyek sok tekintetben eltértek egymástól. 2005-ben a három alcsoport bevonásával elvégzett, több lokuszt magába foglaló szekvencia analízis eredményeként az eddig egységesnek tekintett *C. parapsilosis* fajcsoportot három, egymástól különálló fajjává választották szét. Ezek alapján napjainkban az I. csoportot *C. parapsilosis*, a II. csoportot *C. orthosilosis*, míg a III. csoportot

C. metapsilosis-ként tartják számon (Tavanti és mtsai. 2005). Érdekes módon a *C. parapsilosis* mitokondriális genom struktúrájára jellemző, hogy eltérően *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* fajoktól, ezen faj esetén lineáris szerkezetű mitokondriális genomot találunk. A lineáris mitokondrium 30 kb nagyságú, szerkezetére jellemző, hogy végén az eukariota organizmusok telomer szekvenciájához hasonló ismétlődő struktúrát tartalmaz. A mitokondriális genom nagymértékben kompakt. A mitokondriális genomban megtalálható a légzési lánc tagjainak 14 fehérjéje, az ATP szintáz gén, valamint a mitokondriális riboszómák kis és nagy alegységének felépítésében részt vevő riboszomális RNS gének (Kovac és mtsai. 1984, Nosek és mtsai. 1995, Valach és mtsai. 2012).

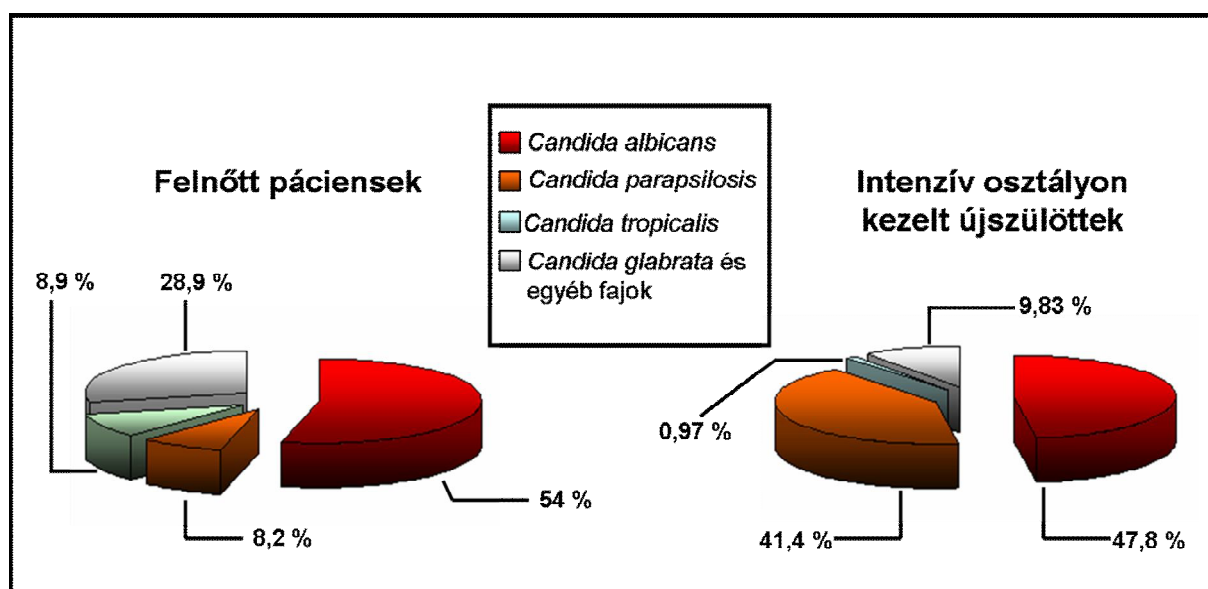
Az élesztő sejtek kerek vagy ovális alakot vehetnek fel. Bizonyos körülmények között, főként citrullin jelenlétében, pseudohifa képzésre képesek, ám valódi hifát nem képeznek (Kim és mtsai. 2006). Makroszkópos megjelenésére jellemző, hogy laboratóriumi körülmények között, komplett táptalajon (YPD, Sabouraud dextróz agar) tenyésztve a telepek fehér, krémszerű megjelenésűek, a telep felszíne törzstől függően lehet sima, karéjos vagy gyűrött. A mikroba jellemzően az egészséges humán mikroflóra részét képezi, ám a növényekről és a talajból izolálható formái is ismertek (Pryszcz és mtsai. 2013).

Hasonlóan a *C. albicans*-hoz, a *C. parapsilosis* sejtfal szerveződésére is egy belső, kompaktabb és egy külső, lazább réteg a jellemző. A belső réteg felépítésében kitin, valamint erre ráépülve β -1,3 glükán váz vesz részt. A sejtfal külső, lazább rétege fehérjékkel asszociált O és N kötött mannóz polimerből épül fel. A két réteget kovalensen kötött β -1,6-glükán-glikofoszfatidilinozitol kapocs rögzíti egymáshoz (Netea és mtsai. 2008). A sejtfal komponenseinek minősége és részaránya nem állandó az élesztő sejtciklusa alatt, hanem egy jól szabályozott, komplex folyamatnak köszönhetően dinamikusan változik (Gow és mtsai. 2012). Bizonyos körülmények között a citokinézis nem fejeződik be, a lefűződő leánysejt nem hagyja el az anyasejtet, hanem erőteljesen megnyúlik, ezzel pseudohifa jöhet létre (Buffo és mtsai. 1984, Mardon és mtsai. 1969).

Számos regionális és nemzetközi tanulmány vizsgálta a *Candida* fajok epidemiológiáját. A 2000 előtti tanulmányok egyértelműen rávilágítanak, hogy legnagyobb mértékben, az összes eset mintegy 37-70%-ában a *C. albicans* felelős a szisztémás kandidiázis kórképének kiváltásáért (Pfaller és mtsai. 2007). Ezzel szemben, az ezredforduló óta egy újabb trend figyelhető meg, miszerint kandidémiás esetek egyre kisebb részéből izolálható *C. albicans*, míg az eddig kisebb jelentőséggel bíró és ezidáig kevésbé tanulmányozott nem-*albicans* fajok egyre nagyobb részarányban okoznak megbetegedéseket. Újabb felmérések szerint Európa valamint Észak-Amerika területén a *C. albicans* által

okozott megbetegedések részaránya mintegy 50%, ezzel szemben a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* valamint a *C. tropicalis* által okozott megbetegedések száma növekszik (Papon és mtsai. 2013, Tortorano és mtsai. 2013). Latin-Amerikában és Dél-Afrikában a nem-*albicans* fajok által okozott megbetegedések részaránya még az előbbieknél is nagyobb mértékű. Ezeken a területeken az izolátumoknak kevesebb, mint a fele bizonyult *C. albicans*-nak, míg a nem-*albicans* fajok közül főként a *C. parapsilosis* emelkedik ki, amely az összes kandidémiás megbetegedés mintegy 25 %-áért volt felelős (Nucci és mtsai. 2013, Kreusch és Karstaedt 2013). Ezeken a területeken a kandidémiás esetek mortalitási rátája kiemelkedően magas, mintegy 60-73% közötti (Kreusch és Karstaedt 2013).

Számos tanulmány felhívja a figyelmet arra a jelenségre, hogy különböző korcsoportokat vizsgálva a kandidémiát kiváltó mikrobák részaránya eltérő. Fiatalabb korcsoportok, elsősorban csecsemők, újszülöttek körében a *C. parapsilosis* részaránya kiemelkedően magasnak bizonyul (Trofa és mtsai 2008, Chow és mtsai. 2012). A különböző geográfiai területekről származó beszámolók szerint az újszülötteket érintő *C. parapsilosis* által okozott megbetegedések száma meghaladja a *C. albicans* által okozott megbetegedések számát (Pammi és mtsai. 2013, Neu és mtsai. 2009). Számos, több évre kiterjedő felmérés eredménye szerint újszülöttek körében a candidémiák kialakulásáért a *C. parapsilosis* mintegy 30-50%-ban tehető felelőssé (Trofa és mtsai. 2008, Neu és mtsai. 2009, Chow és mtsai. 2012) (2. ábra).



2. ábra

Szisztémás kandidiázist kiváltó fajok megoszlása újszülött és felnőtt páciensek körében (Chow és mtsai. 2012 alapján)

Egy tanulmány kimutatta, hogy míg a *C. albicans* a születés során kolonizálja az újszülöttet, addig a *C. parapsilosis* csupán hetekkel később jelenik meg az újszülött mikroflórájában, ez a tény arra utal, hogy a *C. parapsilosis* előzetes kolonizáció nélkül is képes fertőzések kiváltására (Parm és mtsai. 2011). Számos tanulmány felhívja a figyelmet arra, hogy az alacsony születési súllyal világra jött újszülöttek *C. parapsilosis* fertőzések szempontjából különösen veszélyeztetett csoportot képeznek. Az a tény, hogy ezen mikroba nagy gyakorisággal izolálható egészségügyi dolgozók kezéről, magyarázatot adhat ezen megfigyelésre (Trofa és mtsai. 2008, Chow és mtsai. 2012). Rizikófaktorokként tartjuk számon a vénás katéterek alkalmazását, a hosszan tartó antibiotikus kezelést, sebészeti beavatkozást, szervátültetést, neutropéniás állapotot, valamint újszülöttek esetén az alacsony születési súlyt (Almirante és mtsai. 2006).

A szisztémás kandidiázis kialakulásában kiemelkedő szerepet játszik a mikroba biofilm képző képessége, valamint a szekretált hidrolitikus enzimek termelése. Újabb tanulmányok rámutatnak, hogy ezen virulencia faktorokon kívül a gomba zsírsav szintézisében szerepet játszó fehérjék szintén fontos virulencia faktorok (Nguyen és mtsai. 2009, Nguyen és Nosanchuk 2011, Nguyen és mtsai. 2011). A mikrobára jellemző, hogy hatékonyan képes megtapadni és biofilmet képezni nem csak a gazdaszervezeten, hanem a klinikumban használatos egyéb műanyag felszíneken egyaránt. A megtapadás kezdeti szakaszában nagy jelentőséggel bírnak a hidrofób felszínek. *C. parapsilosis* adhéziós képessége akril anyagú felületekhez mintegy másfélszer jobb, míg a szájüregi epiteliális sejteken való megtapadási képessége 20%-al jobb, összevetve a *C. albicans*-sal (Panagoda és mtsai. 2001). A *C. parapsilosis* által képzett biofilmek a *C. albicans*-sal összevetve jóval vékonyabbak, egyszerűbb felépítésűek. Általánosságban a pseudohifák jóval nagyobb gyakorisággal képeznek biofilmet, mint az élesztő formák (Laffey és Butler 2005). Bár a mikroba biofilm képzésének molekuláris mechanizmusa kevésbé ismert, egy tanulmány kimutatta, hogy a *BCR1* transzkripciós faktorra deléciós mutáns törzs biofilm képző képessége szignifikánsan csökkent a vad típusú törzshöz képest, így ezen transzkripciós faktor a biofilm képzés egyik központi szabályozó eleme lehet (Ding és Butler 2007). Továbbá, egy vizsgálat megállapította, hogy bizonyos aminosavak jelenléte elősegíti a biofilm képzést (Kim és mtsai. 2006), valamint a lipáz termelésben deficiens *C. parapsilosis* törzs biofilm képzési képessége szintén nagymértékben csökkent (Gácsér és mtsai. 2007c).

Számos tanulmány vizsgálta a *C. parapsilosis* zsírsav szintézisének virulenciában betöltött szerepét. Érdekes módon a zsírsav bioszintézis folyamatában részt vevő enzimek

szerepet játszanak a kiváltott immunválaszban, a biofilm képzésben és hozzájárulnak a virulenciához *in vivo* kísérletes egér modellben. A *FAS2* (kettes típusú zsírsav szintetáz) homozigóta deléciós mutáns törzs nem volt képes biofilm képzésre és a gazda effektor sejtjei nagyobb hatékonysággal eliminálták a gombasejteket (Nguyen és mtsai. 2009). Az *OLE1* (sztearoil koenzim A deszaturáz 1) deléciós mutáns törzs sejtjei nem voltak képesek pszeudohifa képzésre, valamint ozmotikus és oxidatív stresszre való érzékenységük is megnövekedett. Ezen felül humán szérummal szemben szintén szenzitívnek bizonyultak (Nguyen és Nosanchuk 2011). A *FIT2* (kettes típusú zsír tárolást elősegítő protein) homozigóta deléciós mutáns törzse szintén érzékenynek bizonyult ozmotikus stresszre, valamint csökkent virulenciát mutatott *in vivo* kísérletes egér modellben (Nguyen és mtsai. 2011).

A gomba által szekretált hidrolitikus enzimek közül a virulencia kialakításában kiemelt jelentőséggel bírnak a lipázok, és aszpartil proteinázok. A foszfolipázok virulenciában betöltött szerepe ezzel szemben kisebb jelentőségűnek bizonyul.

A foszfolipázok alapvető funkciója a foszfatidil glicerolok észter kötéseinek hidrolízise. Bár a foszfolipázok fertőzésben betöltött szerepe ezidáig kevésbé tanulmányozott, az általános elképzelés szerint ezen enzimek funkciója a gazda sejtek membrán integritásának megbontása (Ghannoum 2000, Kantarcioglu és Yucel 2002). *C. albicans* esetén számos tanulmány demonstrálta a foszfolipázok virulenciában betöltött szerepét. Ezen tanulmányok szerint a foszfolipázoknak szerepük van a virulencia kialakításában egér szisztémás modell esetén, szerepük van az epitéliális sejtekhez való adhézióban (Barrett-Bee és mtsai. 1985), a gazda sejtbe való penetráció során (Pugh és Cawson 1977), humán epitéliális sejtek inváziójában (Jayatilake és mtsai. 2005), valamint a gazda jelátviteli útvonalainak módosításában (Filler és mtsai. 1991). A *C. parapsilosis* foszfolipázok virulenciában betöltött szerepe nem ennyire egyértelmű. Egyes szerzők beszámoltak foszfolipáz aktivitásról számos klinikai eset kapcsán (Ghannoum 2000), ugyanakkor mások nem mutattak ki ilyen jellegű enzimaktivitást (Kantarcioglu és Yucel 2002). Egy publikáció szerzői csak a szisztémás fertőzésekből származó izolátumok esetén mutattak ki enzimműködést (Dagdeviren és mtsai. 2005), míg mások bőrfelszíni izolátumokban detektáltak enzimaktivitást (Fernando és mtsai. 1999).

A szekretált lipázok katalizálják a triacil glicerolok hidrolízisét és szintézisét egyaránt. Jellemző rájuk a proteolízissel szembeni rezisztencia, a magas hőstabilitás és szerves oldószerekben a magas enantioszelektivitás (Brockerhoff 1974). Általánosságban elmondható, hogy a mikrobiális extracelluláris lipázok szerepe meglehetősen sokrétű. Elsődleges szerepük

a lipidek hidrolízise, így azok szénforrásként való hasznosítása. Ezen az alapvető funkción kívül a szekretált lipázok szerepet játszanak a mikroba gazda szövetein való megtapadás folyamatában, az immunfolyamatok beindításában, illetve azok modulálásában, valamint szerepet játszanak a mikroba védekezésében azáltal, hogy az esetlegesen kompetítorként jelen levő mikroflóra szaporodását gátolják (Schaller és mtsai. 2005, Stehr és mtsai. 2004). *C. albicans* esetén tíz szekretált lipáz gént azonosítottak (*LIP1-LIP10*) (Hube és mtsai. 2000). Szisztémás egér modellben a fertőzést követő 4 óra elteltével a *C. albicans* *LIP8* génje mutatott nagyfokú transzkripciós szintet (Stehr és mtsai. 2004). A vad típusú törzsből származtatott $\Delta/\Delta lip8$ deléciós mutáns törzzsel elvégezve a kísérletet a vad típusú törzshöz képest nagyfokú virulencia csökkenés volt tapasztalható (Gácsér és mtsai. 2007b).

C. parapsilosis-on végzett vizsgálatok két lipáz gént azonosítottak (*CpLIP1*, *CpLIP2*), bár csupán a *CpLIP2* gén kódol aktív fehérjét (Brunel és mtsai. 2004). A *C. parapsilosis* szekretált lipázának virulenciában betöltött szerepét jól demonstrálja, miszerint vad típusú *C. parapsilosis* törzset alkalmazva humán szöveten végzett *in vitro* fertőzőes modellben, a fertőzés során lipáz inhibitort alkalmazva a szöveti károsodás mértéke szignifikánsan kisebb volt, összevetve a csak vad típusú *C. parapsilosis* törzs által okozott szöveti károsodással (Gácsér és mtsai. 2007c). Gácsér és munkatársai a homozigóta $\Delta/\Delta CpLIP1$ - $\Delta/\Delta CpLIP2$ (lipáz deficiens) *C. parapsilosis* törzs vizsgálata során megállapították, hogy a mutáns törzs kevesebb, kevésbé komplex biofilm formálásra képes, mint a vad típusú törzs, lipid gazdag tápközegben a növekedése csökkent mértékű a vad típusú törzzsel összevetve. Ezen felül makrofág sejtek jóval eredményesebben fagocitálják és eliminálják ezen mutáns törzs sejtjeit *in vitro* fertőzőes kísérletek során, valamint csökkent virulenciát mutatnak *in vivo* állatkísérletek során (Gácsér és mtsai. 2007c). A lipáz negatív törzsön végzett megfigyelések rendkívüli fontossággal bírnak, hiszen a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések különösen nagy gyakorisággal fordulnak elő olyan alacsony születési súllyal rendelkező újszülöttek körében, akik lipid gazdag táplálásban részesülnek.

3.3. Szekretált aszpartil proteinázok

Minden proteináz alapvető feladata a peptid kötések hidrolízise, bár a specificitás tekintetében jelentős különbségek mutathatók ki (Barrett és Rawlings 1991). A proteinázok családjá hatásmechanizmusuk alapján négy típusra oszthatóak: szerin, cisztein, metallo és aszpartil proteinázok. Szerin proteinázokra példa a tripszin, kimotripszin és szubtilizin alsaládok, a cisztein proteinázok között találjuk a *Streptococcus* fajok proteinázait, valamint a papaint, míg a metalloproteinázok körébe tartoznak a kollagenázok és a mikrovillus

proteinázok (Barrett 1979). Az aszpartil proteinázok széles körben elterjedtek és számos biokémiai reakció katalíziséért felelősek (Davies 1990). Jól ismert aszpartil proteinázok a HIV aszpartil proteináza, a humán pepszin és renin.

Élesztők körében az aszpartil proteinázok családján belül két nagyobb csoportját különböztetik meg: az első csoportba az úgynevezett élesztő aszpartil proteinázok (*yeast aspartyl proteinase/yapsin* – Yap/Yps) tartoznak (Krysan és mtsai. 2005), míg a második csoportot a szekretált aszpartil proteinázok (*secreted aspartyl proteinase* – Sap) képezik (Hruskova-Heidingsfeldova 2008).

A yapszin fehérjék alapvető funkciója a sejtfa integritásának megőrzése, valamint szerepük van a sejt-sejt közötti interakciókban is. Szintézisük során, hasonlóan más aszpartil proteinázokhoz, a yapszin fehérjék szintén inaktív zimogénként szintetizálódnak. A zimogénen belül az aktív centrumot egy proszegmens fedi el. Ez a proszegmens egy sóhid által stabilizálódik, amely a zimogén propeptidjének lizin és a katalitikus diád aszparaginsav maradéka közt található. Savas környezetben az aszparaginsav aminosav protonálódása a sóhid felbomlásához vezet, melynek során a zimogén aktiválódása elkezdődik. Az aktiválódás két lépésből áll: elsőként a propeptid egy intramolekuláris reakció során hasítódik, majd második lépésként a proszegmens vágódik le az érett enzimről (Gagnon-Arsenault és mtsai. 2006). A yapszin család fehérjéi között a katalitikus domén a leginkább konzervált régió. Az aktív centrumban két aszparaginsav fedezhető fel, egy erősen konzervált szekvencia motívumon belül. A központi motívum: Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, ahol az Xaa valamilyen hidrofób aminosav maradék, az Xbb pedig szerin vagy threonin (Gagnon-Arsenault és mtsai. 2006). Struktúrájukat tekintve az aszpartil proteinázok „kétkarú” enzimek, ahol egy-egy karon, az aktív centrum árkában találhatók a katalitikus aszparaginsav maradékok. További jellegzetességük, hogy ellentétben a szekretált aszpartil proteinázokkal, a yapszin fehérjék nagy mértékben glikoziláltak. A glikoziláció fehérjétől függően lehet O és N jellegű is (Ash és mtsai. 1995, Komano és Fuller 1995, Lipke és Ovalle 1998). A yapszin fehérjékre jellemző, hogy C-terminális végükön glikozilfoszfatidilinozitol (GPI) módosítás játszódik le az érés folyamán, melynek eredményeképpen ezen fehérjék a sejtfalba képesek rögzülni (Gagnon-Arsenault és mtsai. 2006).

Érdekes módon a CUG kládon kívül eső *C. glabrata* esetén, amely filogenetikailag a *Saccharomyces cerevisiae*-hez áll közel, más szekretált aszpartil proteinázt nem találunk, csupán yapszin típusú fehérjét (Krysan és mtsai. 2005). *C. glabrata* esetén tizenegy yapszin fehérjét kódoló gént találunk. Virulenciában betöltött szerepükre utal, hogy J774A.1 makrofág sejtvonallal végzett koinkubáció során az *YPS1* és *YPS7* gének kivételével az összes többi

YPS gén jelentősen emelkedett transzkripció szintet mutatott, összehasonlítva a kontrollként alkalmazott, csak a fagocita sejtek tápközegében nevelt élesztők *YPS* génjeihez képest. A sejtfal integritásának fenntartásában betöltött szerepükre utal, hogy az *yps(1-11)Δ* deléciós törzs növekedési rátája jóval elmaradt a vad típusú törzs növekedéséhez képest, ozmotikus, valamint sejtfalli stresszorok alkalmazása esetén. *In vivo* egérkísérlet során sikerült kimutatni továbbá, hogy az *yps(1-11)Δ* deléciós törzs lényegesen kisebb virulenciával bír, mint a vad típusú törzs (Kaur és mtsai. 2007).

A CUG kládba tartozó *Candida* fajok körében a *C. albicans* Sap9 és Sap10 fehérjéit azonosították, mint yapszin-szerű fehérjéket. Ezen fehérjék, hasonlóan a yapszin típusú fehérjékhez szintén C-terminális részükön egy glikozilfoszfatidilinozitol csoport megkötésére képes helyet tartalmaznak. Ezen kívül, ellentétben a többi *C. albicans* Sap fehérjével ez a két fehérje gazdagon N glikozilált, a Sap9 esetén öt, míg a Sap10 esetén tíz ilyen helyet találunk (Albrecht és mtsai. 2006). Ezidáig a CUG kládba tartozó fajok közül csupán a *C. albicans* ezen két fehérjéje, amely bizonyítottan GPI-kötött fehérje, ezáltal a yapsin fehérjékhez hasonló szerkezetű (Albrecht és mtsai. 2006).

A CUG kládon belül a *C. albicans*-on kívül számos más patogén faj is termel szekretált aszpartil proteinázokat. *C. albicans* esetén tíz (*SAP1-SAP10*) szekretált aszpartil proteináz gént találunk, amely egy géncsaládot alkot (Hube és Naglik 2001). Aminosav sorrendjük homológiái alapján a géncsalád kisebb alcshaládokra osztható [*SAP1-3*, *SAP4-6*, *SAP9-10* (a *SAP7* és *SAP8* gének divergensek, nem tartoznak egyetlen alcshaládba sem)] (Naglik és mtsai. 2003). A klinikailag releváns nem-*albicans* fajokban is nagy számban jelen vannak ezen aszpartil proteináz gének ortológjai. *C. tropicalis* esetén négy (*SAPT1-SAPT4*), *C. dubliniensis* esetén nyolc (*SAPCD1-SAPCD4*, *SAPCD7-SAPCD10*), valamint *C. parapsilosis* esetén három (*SAPP1-SAPP3*) szekretált aszpartil proteináz gént találunk (Pichova és mtsai. 2001, Zaugg és mtsai. 2001). Fontos megjegyezni, hogy az összes klinikailag releváns *Candida* faj szekretált proteázai egységesen az aszpartil proteinázok családjába tartoznak, szerin, cisztein és metalloproteinázokat nem azonosítottak ezen fajokban (Naglik és mtsai. 2003, Hruskova-Heidingsfeldova 2008).

Minden szekretált aszpartil proteináz fehérje preproenzimként szintetizálódik a durva felszíni endoplazmatikus retikulumban. Ezen a helyen a szignál peptidet egy szignál peptidáz lehasítja. A proenzim ezután transzportálódik a Golgi apparátusba, ahol egy membrán kötött Kex2 nevű proteináz általi hasítással alakul ki az érett fehérje. *C. parapsilosis* esetén kimutatták, hogy a Sapp1 fehérje aktiválódása a Kex2 fehérje nélkül, autokatalitikusan is végbemehet (Dostal és mtsai. 2005). Miután az érett fehérje kialakult, szekretorikus

vezikulákba kerül, amely a plazma membránhoz szállítja azt. Itt, amennyiben glikozilfoszfatidilinozított köt a fehérje (Sap9, Sap10 esetén), úgy az enzim sejtfalhoz kötötten marad, míg, ha ilyen poszttranszlációs módosítás nem történik, úgy az extracelluláris térbe jut a fehérje (Naglik és mtsai. 2003, Vinterova és mtsai. 2011). Kimutatták, hogy *in vitro* rendszerben a Sap9 és Sap10 fehérjék képesek a mikroba saját, sejtfalhoz kötött fehérjeinek a hasítására, melyek mind a biofilm képzésben, mind a mikroba sejtfalának szintézisében fontos szerepet játszanak (Schild és mtsai. 2011).

C. parapsilosis esetén kimutatták, hogy a Sapp1 fehérje a sejtfalon történő áthaladás során nem kovalens kötésekkel kötődik a sejtfali komponensekhez, valamint sejtfalhoz asszociált fehérjékhez. Kimutatták továbbá, hogy elsőként az érett fehérje aktív centruma az, amely áthalad a sejtfalon, így a fehérje már a sejtfalhoz asszociáltnak is funkcióképes (Vinterova és mtsai. 2011). *Candida* fajok szekretált aszpartil proteináz izoenzimek mérete 35 és 50 kDa között változik, *C. parapsilosis* esetén mind a Sapp1, mind a Sapp2 fehérje 37 kDa tömegűnek adódott. A szekretált aszpartil proteináz izoenzimek pH optimuma a savas tartományba esik, amely *C. albicans* esetén pH 2 és pH 7 közé esik, míg *C. parapsilosis* esetén mind a Sapp1, mind a Sapp2 izoenzimek pH optimuma 4 körül található (Naglik és mtsai. 2003, Merkerova és mtsai. 2006).

A *C. parapsilosis* ezidáig három azonosított szekretált aszpartil proteináz szekvenciája (SAPP1-SAPP3) közül kettő fehérje (Sapp1, Sapp2) termeltetése és biokémiai jellemzése történt meg (Dostal és mtsai. 2005, Merkerova és mtsai. 2006, Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009). Az előzőekben leírtak szerint, ezen két fehérje is pre-pro enzim formájában szintetizálódik. *In vitro*, induktív körülmények között (BSA tartalmú tápközegben) mindkét fehérje termelődése és szekréciója lezajlik, ám a Sapp1 fehérje legalább egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben termelődik, mint a Sapp2 fehérje. Érdekes módon, míg a Sapp1 fehérje termelődése csak külső fehérje forrás hozzáadása során volt megfigyelhető, addig a Sapp2 fehérje termelődése nem induktív körülmények között is jelen volt (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009). Aktiválódásukra ez esetben is igaz, hogy a *C. parapsilosis* Kex2 szerin proteáz fehérjéje végzi, ám a pro-Sapp1 fehérje analízise során kiderült, hogy ez a fehérje savas körülmények (pH 3-4) között autokatalitikus aktiválódásra is képes. Az autokatalitikusan aktiválódott Sapp1 fehérje N-terminálisán egy aminosavval rövidebbnek bizonyult a Kex2 által aktiválódott formához képest, ám ezen csonkolt fehérje proteolitikus aktivitása azonosnak bizonyult a szerin proteáz által aktivált fehérjével. Ezzel szemben a Sapp2 fehérje kizárólag a Kex2 fehérje általi aktiválódásra képes, sem savas környezetben autokatalitikusan, sem a Sapp1 fehérje általi aktiválódásra nem képes (Merkerova és mtsai.

2006). A jellemzően egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségű termelődés mellett, szintetikus peptidek, mint szubsztrátok alkalmazásával kimutatható volt, hogy a Sapp1 fehérje katalitikus aktivitása jóval nagyobb és szubsztrát specifitása szélesebb körű, mint a Sapp2 fehérjének (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009).

Mára a Sapp1 és Sapp2 fehérjék kristályszerkezete és háromdimenziós szerkezete is elérhetővé vált. A Sapp1 fehérje kristályszerkezetének analízise során a fehérje főleg β redős szerkezetet mutatott, melyen belül két domén fog közre egy mélyedést, amely a szubsztrát befogadására képes. Minden domén tartalmaz egy katalitikus aszparaginsav helyet, melyek jellemzően DTG (Aszparaginsav-Treonin-Glicin aminosav hármas), vagy DSG (Aszparaginsav-Szerin-Glicin aminosav hármas) motívumok részeként vannak jelen. Az aktív centrum három „entrance loop” szerkezetet tartalmaz, amely jellemzően más Sap izoenzimiek struktúrájának is része (Dostal és mtsai. 2009, Abad-Zapatero és mtsai. 1996). Bár a Sapp1 és Sapp2 fehérjék aminosav sorrendje nagyfokú homológiát mutat, a strukturális modellek összehasonlítása azonban jelentős mértékű eltéréseket fedett fel. Sapp2 fehérje esetén egy négy aminosavnyi inszerció figyelhető meg a Sapp1 fehérjéhez képest a 293.-296. aminosavak esetén, amely egyedi eset aszpartil proteinázok esetén. A négy aminosavnyi inszerció változatos szerveződéseket tesz lehetővé az enzim szerkezetében, melyek az aktív centrumot is érinthetik. Egy arginin inszerciója figyelhető meg a Sapp2 esetén a 75. pozícióban, amely az aktív centrumot elfedő rész bázisánál helyezkedik el. Az ily módon kibővült fedő rész és az előbb említett négy aminosavnyi inszerció jelenléte nagymértékben befolyásolhatja az enzim aktív centrumának hozzáférhetőségét (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009).

A szekretált aszpartil proteinázok termelése és *Candida* fajok virulenciája közt korreláció fedezhető fel. A *C. albicans*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* fajok *in vitro* jóval több proteinázt termelnek, mint a klinikailag kevésbé jelentős fajok, például a *C. kefyr* vagy a *C. guilliermondii*, (Macdonald és Odds 1983, Gácsér és mtsai. 2007a). Számos *Candida* faj genomjában találhatunk aszpartil proteináz géneket. Monod és munkatársai (1994) a *C. albicans* *SAP1* génjét, mint jelölt próbát alkalmazva *EcoRI* emésztett *C. guilliermondii* genomi DNS-en végzett RFLP analízise alapján négy fragmentumot azonosított, habár *in vitro* BSA tartalmú tápközegben proteináz termelés nem volt kimutatható (Monod és mtsai. 1994). A szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepéről a legtöbb információ *C. albicans*-on végzett vizsgálatokból áll rendelkezésünkre.

A szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepe *C. albicans*-ban régóta tanulmányozott, munkánk kezdetén a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepéről minimális információ állt rendelkezésünkre.

Több tanulmány is beszámolt arról, hogy *C. albicans* által okozott vaginális kandidiázisban szenvedő betegekről izolált törzsek proteináz termelése kétszerese volt, a tünet nélküli *C. albicans*-t hordozó egyénekről izolált törzsekkel összehasonlítva (Agatensi és mtsai. 1991, De Bernardis és mtsai. 1990). Egy másik tanulmány szerint 21, vaginitiszben szenvedő, HIV pozitív, női páciensből származó izolátumok négyszer nagyobb mennyiségű Sap fehérjét termeltek, mint 7 HIV pozitív, ám vaginitiszben nem szenvedő, vagy 31 HIV negatív, de kandidiális vaginitiszben szenvedő pácienstől származó izolátumok (De Bernardis és mtsai. 1999).

A *C. albicans* faj tíz *SAP* génje az élesztő életciklusától, valamint a fertőzés helyétől és súlyosságától függően meghatározott rendben expresszálódik (Hube 1998). Induktív körülmények közt a *SAP2* gén mutatja a legnagyobb mértékű expressziót, míg a *SAP1* és *SAP3* gének, hasonlóan a *SAP4-SAP6* alcsaládhoz, az élesztő – hifa átmenete során mutatnak magas szintű expressziót. A *SAP7* és *SAP8* gének jellemzően hőmérséklet által regulált gének. A *SAP9* és *SAP10* gének konstitutívan expresszálódnak csaknem minden környezeti viszony esetén, mind a mikroba élesztő, mind hifa alakjában (Naglik és mtsai. 2003). Rekonstruált humán epiteliális modell esetén Schaller és munkatársai kimutatták, hogy a fertőzés során a *SAP* gének expressziója szorosan koordinált ($SAP1, SAP3 > SAP6 > SAP2 > SAP8$). Ezen esetben a Sap4, Sap5 és Sap6 termelődése nem okozott szöveti károsodást (Schaller és mtsai. 1999). A Sap2 fehérje a *C. albicans* által legnagyobb mennyiségben szekretált aszpartil proteináz. A fehérjéről kimutatták, hogy számos, gazdaszervezet által termelt antimikrobiális fehérje bontására képes. Ezen fehérjék közt találjuk a mucint, amely a száj nyálkahátya felszínét védi, valamint a szekretikus IgA fehérjét (Colina és mtsai. 1996, Ruchel 1986). Összevetve más típusú immunglobulinokkal, az IgA jóval rezisztensebb proteolitikus emésztésekkel szemben, valamint a szekretikus IgA számos toxint és enzimet képes semlegesíteni. A *C. albicans* Sap2 fehérjeje képes az IgA bontására, ezáltal elősegítve a mikroba bukkális epiteliális sejtekhez való tapadását, valamint terjedését (Kilian és mtsai. 1988). Morschhauser és munkatársai kimutatták, hogy a *C. albicans* proteinázok képesek voltak elbontani egy humán endotheliális sejtvonal mind szolubilis, mind az immobilizált extracelluláris mátrix proteinjeit, amely eredmény arra enged következtetni, hogy ezen fehérjék elősegítik a *C. albicans* disszeminációját (Morschhauser és mtsai. 1997). Ezen túlmenően a *C. albicans* Sap fehérjék, széles szubsztrátspecifitásuknak köszönhetően

eredményesen bontják a gazdaszervezet antimikrobiális fehérjéit, mint például a laktoferrin, laktoperoxidázt, katepszin D fehérjét, valamint a komplement rendszer komponenseit (Gropp és mtsai. 2009). Egy tanulmány felhívja a figyelmet a proinflammatorikus interleukin-1 β prekursorából történő aktiválódására, a *C. albicans* Sap2 hatására. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a Sap2 fehérjének szerepe van a gyulladásos válasz kialakulásában és fenntartásában (Beausejour és mtsai. 1998).

Számos tanulmány vizsgálta *C. albicans* esetén a szekretált aszpartil proteinázok, valamint egyéb virulenciafaktorok közti kapcsolatot. Már egy korai tanulmány kimutatta, hogy *in vitro* rendszerben epiteliális sejtekhez tapadt élesztő sejtek jóval nagyobb proteináz termelést mutattak az epiteliális sejtekhez nem kitapadt élesztő sejtekkel összevetve (Ghannoum és Abu Elteen 1986). *C. parapsilosis* esetén *in vitro* humán epiteliális modellt alkalmazva szintén sikerült igazolni a *SAPP* gén nagyobb mértékű expresszióját az epiteliális szövethez tapadt élesztő sejtek esetén (Silva és mtsai. 2009).

Régóta tudott, hogy szoros korreláció áll fenn *C. albicans* esetén a *SAP4* és *SAP6* gén expressziója és a mikroba élesztő – hifa átmenete között (Hube 1998). A *SAP4* és *SAP6* gén promóter régiójának analízise során a Tec1 transzkripció faktor kötőhelyének konszenzus szekvenciáját fedezték fel [CATTC(A/C)] (Schweizer és mtsai. 2000). A homozigóta deléció Δ/Δ tec1 *C. albicans* mutáns törzs esetén kimutatták, hogy a törzs hifa képzésre és a *SAP4* és *SAP6* gén expressziójára *in vivo* egyaránt képtelen, amely eredmény azt támasztja alá, hogy a hifa képzés valamint a proteináz termelés között szoros összefüggés áll fenn, azok útvonalai szorosan kapcsolatosak. A kapcsolt útvonal koncepcióját további tanulmányok is alátámasztották (Schroppel és mtsai. 2000, Felk és mtsai. 2002). A Δ/Δ cpg1 (egy mitogén aktivált protein kináz foszfataz) deléció mutáns törzs hiperfilamentációs fenotípust, valamint megnövekedett *SAP4* és *SAP6* expressziót mutatott (Schroppel és mtsai. 2000). További bizonyítékul szolgált, hogy rágsáló szisztémás peritoneális modellt alkalmazva a Δ/Δ efg1 törzs jóval kisebb mértékű hifa képzést és *SAP4*, *SAP6* expressziót mutatott, valamint ebből kifolyólag jóval kevésbé volt képes károsítani a parenchimális szerveket (Felk és mtsai. 2002). Érdekes módon, a Δ/Δ sap4- Δ/Δ sap5- Δ/Δ sap6 deléció törzs esetén szisztémás modellben csökkent inváziós képességet tapasztaltak, ám ezen törzs hifa képzésre képes volt. A *SAP5* gén expressziója nem függött a hifa képzéstől, ám a két fő hifaképzéshez szükséges fehérje jelenléte (Cph1 és Efg1) szükséges volt a *SAP5* gén expressziójához (Staib és mtsai. 2002). Összességében ezen vizsgálatok azt mutatják, hogy nem csak a proteináz termelés és a hifaképzés szabályozása mutat szoros korrelációt, hanem a *C. albicans* hifasejteknek szükségük van a proteináz termelésre, annak érdekében, hogy a

mikroba invazívva válik *in vivo*. A *C. albicans* WO-1 törzse esetén a white – opaque átmenet vizsgálata kimutatta, hogy ezen átmenet számos celluláris változás eredménye, melyek érintik a proteináz termelést is (Soll 1992). Ezzel egyidőben kimutatták, hogy mind a WO-1, mind a *C. albicans* 3153A jelű törzsek fenotipikus változása és proteáz termelése között kapcsolat van (Morrow és mtsai. 1994, Morrow és mtsai. 1993). Mindkét törzs esetén a *SAP1* expressziója nagymértékű növekedést mutatott a fenotipikus váltás során, míg a *SAP2* gén aktiválódását mindkét stádiumban megfigyelték, ám csupán exogén protein hozzáadása során.

Számos tanulmány vizsgálta a Sap fehérjék által kiváltott immunglobulin termelést. Macdonald és Odds voltak az elsők, akik proteináz – specifikus IgG antitest termelését mutatták ki szisztémás candidiasis során (Macdonald és Odds 1980). Száj-garatüregi kandidiázisban szenvedő HIV pozitív paciensek esetén, emelkedett mennyiségű Sap1, Sap2 és Sap6 ellen termelődött IgA antitest volt detektálható, a HIV pozitív, de kandidiázisban nem szenvedő, valamint a teljesen egészséges kontroll csoportokkal összevetve (Drobacheff és mtsai. 2001). De Bernardis és munkatársai rágszáló vaginitisz modell esetén beszámoltak arról, hogy a *C. albicans* Sap2 elleni immunizálás, vagy a fehérje ellen termeltetett monoklonális antitest alkalmazása részben meggátolta a kandidiális vaginitisz kialakulását (De Bernardis és mtsai. 1996). Ez volt a legelső eset, melyben kimutatták az anti-Sap antitestek védő hatását.

A *C. albicans* által termelt proteinázok elleni lehetséges védekezés lehet bizonyos proteináz inhibitorok használata. Colina és munkatársai voltak az elsők, akik kimutatták, hogy a mucin Sap proteinázok általi degradációja *in vivo* gátlódik pepstatin jelenlétében (Colina és mtsai. 1996). Humán epitéliális sejtvonal által termelt szolubilis, valamint immobilizált fehérjék Sap fehérjék általi bontását *in vitro* szintén sikerült gátolni pepsztatint alkalmazva (Morschhauser és mtsai. 1997). *In vivo* egér peritonitisz modellben 1 mg/kg koncentrációban alkalmazott pepsztatin adagolása szignifikánsan csökkentette a lép és hasnyálmirigy szöveti károsodását (Kretschmar és mtsai. 1999). Ezzel szemben, *in vivo* intravénás egér modell fertőzése során a pepsztatin alkalmazása nem váltott ki ilyen jellegű védő hatást (Fallon és mtsai. 1997), amely arra enged következtetni, hogy bár a fertőzés kezdeti stádiumában pepsztatin alkalmazása eredményesen gátolja a mikroba kolonizációját, ám a mikroba terjedését meggátolni már nem képes. Ugyanezen tanulmány, *SAP* génekre deléciós törzsek alkalmazásával kiderítette, hogy a pepstatin a Sap4, Sap5 és Sap6 fehérjék gátlása által fejt ki a hatását.

C. parapsilosis, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* *in vitro* rekonstruált humán epitéliális szöveti fertőzés esetén pepstatin A alkalmazása során szintén kisebb mértékű szöveti károsodás volt megfigyelhető (Gácsér és mtsai. 2007a).

A HIV vírus által termelt proteináz szintén az aszpartil proteázok közé tartozik, így a pepstatin A proteináz inhibitoron kívül a HIV proteinázok inhibitorait is vizsgálták, mint lehetséges terápiás szereket. Négy HIV proteináz inhibitor (ritonavir, saquinavir, indinavir és nelfinavir) vizsgálata során a ritonavir bizonyult a legeredményesebb *C. albicans* Sap2 proteáz inhibitornak ($K_i=0,34 \mu\text{M}$) (Borg-von Zepelin és mtsai. 1998). A négy proteináz inhibitor közül csak a ritonavir és a saquinavir volt képes gátolni a *C. lusitaniae*-ből, *C. parapsilosis*-ből *C. tropicalis*-ből és a *C. albicans*-ból tisztított Sap proteázok aktivitását (Pichova és mtsai. 2001). *In vitro* rekonstruált humán epitéliális modellt alkalmazva a saquinavir képes volt a *C. albicans* által okozott szöveti károsodást mérsékelni (Korting és mtsai. 1999), míg *in vivo* patkány vaginitisz modellt alkalmazva a ritonavir és indinavir a flukonazollal összevethető mértékű antifungális hatás kiváltására volt képes (Cassone és mtsai. 1999).

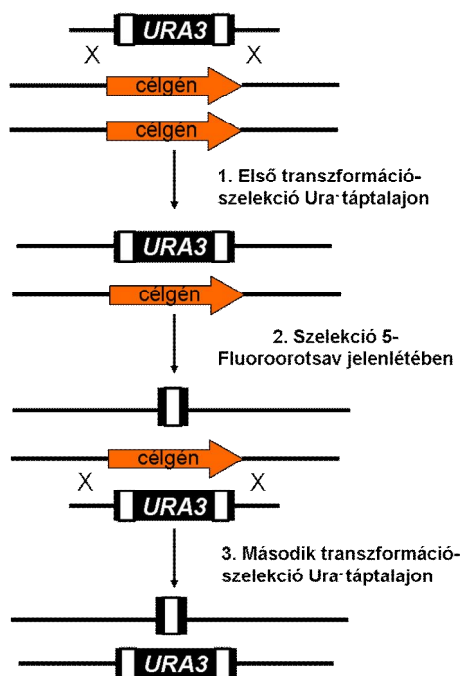
In vivo egér kísérletben a Sap2 alkalmazása akár intakt, akár denaturált formában védő hatást váltott ki intraperitoneális *C. albicans* fertőzés esetén. Minden esetben megfigyelhető volt a szérumban jelenlévő anti-Sap2 antitest, valamint annak passzív transzportja nagymértékben képes volt csökkenteni a gomba által vesében okozott gyulladást (Vilanova és mtsai. 2004).

Mindezen adatok rámutatnak, hogy a szekretált aszpartil proteinázok jelentős szerepet játszanak a *C. albicans* virulenciájában. *C. parapsilosis* esetén ezen proteinázok virulenciában betöltött szerepe kevésbé ismert. Ennek egyik oka, hogy míg *C. albicans* esetén a knock-out és overexpressziós mutáns törzsek létrehozása régóta megoldott, addig *C. parapsilosis* esetén ezen eszköztár napjainkban is kidolgozás alatt áll.

3.4. Gén deléció és over-expressziós módszerek *Candida* fajokban

A *C. albicans* és a nem-*albicans Candida* fajok többsége diploid organizmus, melyek nem rendelkeznek szexuális ciklussal. A diploid jelleg miatt a molekuláris genetikai markerek alkalmazása hosszú ideig nehézséget jelentett ezen fajok esetében (Papon és mtsai. 2012). *Candida* fajok esetén két nagy csoportja alkalmazható a szelekciót biztosító géneknek, amelyek genetikai módosítások kivitelezését teszik lehetővé. A két nagy csoport az auxotrófia markerek, valamint a drog rezisztencia kazetták alkalmazása.

Auxotrófia markerek alkalmazása. Annak érdekében, hogy az auxotrófia markerek alkalmazása lehetővé váljon élesztő fajok esetén, elsőként ezen élesztő fajok auxotróf törzseinek izolálása, valamint komplementációs analízise és metabolikus útvonalainak feltérképezése történt meg (Kakar és Magee 1982). Az izolált auxotróf törzs esetén a az auxotrófiát komplementáló enzim génjének alkalmazása használható, mint szelekciós marker. *C. albicans* esetén számos megfigyelés a BWP17 tripla auxotróf (*his1*, *arg4*, *ura3*) törzshöz köthető, amelynél a *HIS1*, *ARG4* és *URA3* vad típusú gének, mint szelekciós markerek alkalmazhatók (Wilson és mtsai. 1999, Samaranayake és Hanes 2011). Az 5-fluoroorotsav alkalmazása, amely prototróf törzsekre toxikus hatású, lehetőséget teremtett az *URA3* mediált transzformációs rendszer („URA Blaster” rendszer) kidolgozására, melynek alkalmazásával számos, homozigóta deléciós mutáns törzs létrehozása és azok fenotipikus jellemzése lehetségessé vált. Az „URA Blaster” konstrukciónak sok változatát kidolgozták. A transzformálandó törzs ezen rendszer esetén a *C. albicans* uracil auxotróf törzse. Az elsőként kidolgozott konstrukció az *URA3* marker upstream és downstream végén a *Salmonella typhimurium*-ból származó *hisG* direkt ismétlődéseket tartalmazta, amely lehetővé tette az *URA3* gén integráció utáni spontán rekombináció útján történő kivágódását. Az 5-fluoroororát alkalmazásával lehetővé vált a vad típusú *URA3* gén kontraszelekciója (Noble és Johnson 2007, Fonzi és Irwin 1993) (3. ábra).

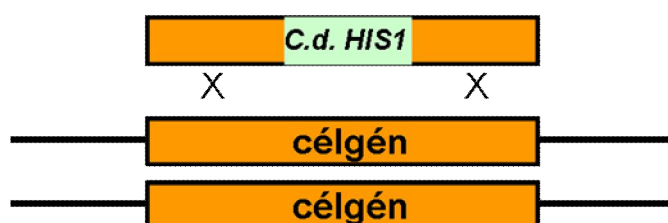


3. ábra

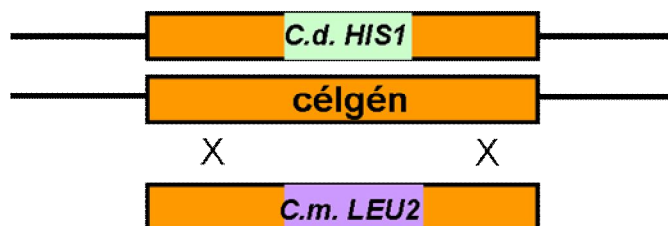
Az „URA Blaster” rendszer működése. (Fonzi és Irwin 1993 alapján).

Egy későbbiekben kidolgozott deléciós konstrukció az *URA3* marker gén mellett a *C. albicans* *SAP2* gén promotere által szabályozott *caFLP* rekombináz gént tartalmazta, amely a domináns szelekciós markert alkalmazó nourseothricin kazettához hasonlóan prototróf deléciós mutáns törzsek létrehozását tette lehetővé. A konstrukció használatával sikeresen létrehozták a *C. albicans* $\Delta/\Delta cdr1$ és $\Delta/\Delta mdr1$ homozigóta deléciós törzseit (Morschhauser és mtsai. 1999, Staib és mtsai. 2000). Szintén *C. albicans*-ban homozigóta deléciós mutánsok rövid időn belüli létrehozását tette lehetővé egy kettős auxotrófiát komplementáló rendszer alkalmazása (Noble és Johnson 2007, Noble és Johnson 2005), (4. ábra).

1. Első allél deléciója



2. Második allél deléciója



4. ábra

C. albicans-ban kidolgozott géndeléciós módszer kettős auxotrófia marker (*HIS1*, *LEU2*) alkalmazásával. (Noble és Johnson 2005 alapján).

Ez esetben kiindulási törzsként egy kettős, hisztidin és leucin auxotrófia markert hordozó *C. albicans* izolátum szolgál. A célzott gén deléciója során a két allél kiütésével egyidejűleg az auxotrófia markerek komplementációja is megtörténik: a hisztidin auxotrófia marker komplementációja *C. dubliniensis* *HIS1*, a leucin auxotrófia marker komplementációja pedig *C. maltosa* *LEU2* gén bevitelével történik. *C. parapsilosis* esetén szintén hasonló módszerrel sikeresen végrehajtottak géndeléciót (Connolly és mtsai. 2013).

Hygromycin B rezisztencia marker. Az elsőként alkalmazott domináns szelekciós marker, melyet *Candida* fajokban alkalmaztak a hygromycin B rezisztencia marker (*HPH*) volt (Hara és mtsai. 2000). Az alkalmazott bakteriális *hph* ORF-ben elsőként a kilenc CTG kodont módosították CTC kodonná. A markert elsőként *C. tropicalis*-ban alkalmazták. Ennek érdekében a módosított hygromycin B gén expresszióját a *C. tropicalis* foszfoglicerát-kináz

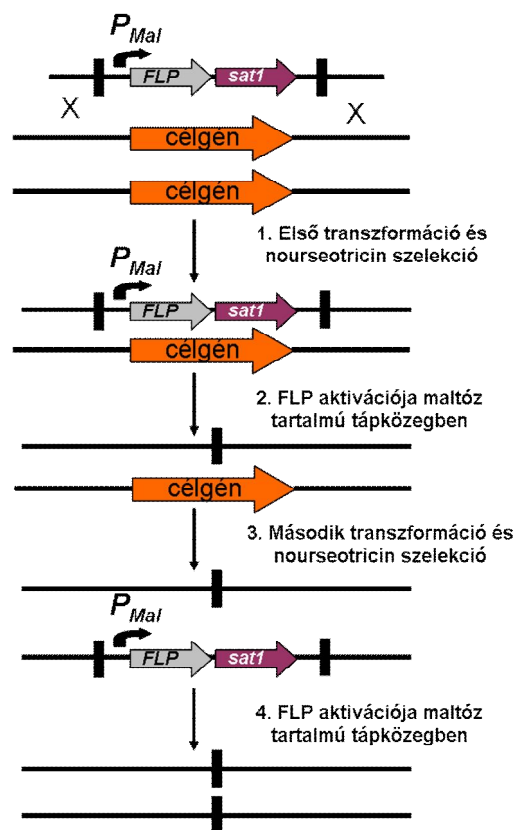
(*PGK*) génjének szabályozó régiójával végezték. Egy évvel később ezt a konstrukciót alkalmazva *C. tropicalis*-ban létrehozták a homozigóta *ura3* deléciós mutánst (Hara és mtsai. 2001). *C. albicans* esetén a bakteriális *hph* gén kilenc CTG kodonját egyéb, leucint kódoló kodonra módosították, valamint a *C. albicans* kodon felhasználási preferenciájának megfelelően egyéb módosításokat is végrehajtottak. A módosított szekvenciát a *C. albicans* *TEF2* promotere és *ACT1* terminátor régiója közé klónozták. Az így kapott konstrukció segítségével számos *C. albicans* izolátum transzformációját sikeresen végrehajtották (Basso és mtsai. 2010). Millerioux és munkatársai az eredeti, 2001-ben elkészített *HPH* marker segítségével sikeres transzformációt hajtottak végre *C. guilliermondii* izolátumokon (Millerioux és mtsai. 2011). A *Candida* fajok többsége bár szenzitívnek bizonyul a hygromycin B-vel szemben, ám csupán magas koncentráció (400-1000 µg/ml) esetén (Papon és mtsai. 2012).

Phleomycin/zeocin rezisztencia marker. Ezen rezisztencia marker *Candida* fajokra optimalizálása és alkalmazása 2003-ban történt meg (Tang és mtsai. 2003). A *Streptoalloteichus hindustanus ble* génje, amely egy glioxiláz fehérjét kódol, rezisztenciát biztosít a bleomycin/phleomycin/zeocin antibiotikum csoporttal szemben. Az optimalizálás során az öt CTG kodont ebben az esetben is más, leucint kódoló tripletekre cserélték. *C. rugosa*-ba való transzformálást követően a marker gént sikeresen expresszáltatták *S. cerevisiae*-ből származó *GAL1* és *TEF1* gének promotereinek vagy a *C. rugosa* *LIP3* promoterének segítségével. A *Staphylococcus aureus* (MRSA) 252 *ble* génje nem tartalmaz CTG kodont. Ezen markert alkalmazva Dmytruk és munkatársai sikeres transzformációt hajtottak végre *C. famata* esetén (Dmytruk és mtsai. 2011). A transzformáló konstrukció a *ble* gén mellett a *C. famata* *TEF1* génjének promoterét tartalmazta. Bár a *Candida* fajok általánosságban szenzitívnek bizonyulnak a bleomycin/phleomycin/zeocin antibiotikum csoporttal szemben, mégis nagy számban fordul elő spontán rezisztencia kialakulása ezen antibiotikum csoporttal szemben (Papon és mtsai. 2012).

Mikofenolsav rezisztencia marker. A *C. albicans* inozin 5'-monofoszfát dehidrogenázt kódoló *IMH3* génjét *C. albicans*-ban túlműködtetve mikofenolsav rezisztenciát sikerült kiváltani (Kohler és mtsai. 1997). A markert eredményesen alkalmazták, mint riporter gént *C. albicans*-ban stádium specifikusan kifejeződő virulencia faktorok, valamint withe-opaque fenotípus váltás vizsgálatához (Staib és mtsai. 2000, Strauss és mtsai. 2001). Helyspecifikus rekombinázzal való kombinációban géndelécio létrehozásához is sikeresen felhasználták a markert (Morschhauser és mtsai. 2005). Az elmúlt évtized során ezzel a

domináns szelekciós markerrel transzformáltak más *Candida* fajokat is (Gácsér és mtsai. 2005, Kosa és mtsai. 2007).

Nourseotricin rezisztencia marker. Az *E. coli* *sat1* génje, amely sztreptotricin aciltranszferázt kódol, rezisztenciát biztosít a nourseothricinnel szemben. Ebben az esetben a CTG kodonokat CTT kodonokkal helyettesítették. A módosított *CaSAT1* szekvenciát sikeresen expresszáltatták *C. albicans*-ban, annak *ACT1* promoterét és *PCK1* terminátorát alkalmazva (Roemer és mtsai. 2003). Egy évvel később, ezen optimalizált szekvenciának egy másik változatát is kidolgozták, ahol a *C. albicans* *ACT1* promoter és *URA3* terminátor szekvenciáját alkalmazták (*caSAT1*) (Reuss és mtsai. 2004). Ugyanezen munka során a *caSAT1* marker flipper variánsát is kidolgozták, lehetőséget nyitva több gén deléciójához, ugyanabban az organizmusban (5. ábra).



5. ábra

A *caSAT1* flipper rendszer működése (Reuss és mtsai. 2004, Noble és Johnson 2007 alapján).

A *caSAT1* flipper rendszer esetén a domináns szelekciós marker helyspecifikus rekombinázorok segítségével eliminálhatóvá válik. A konstrukció az *FLP* rekombinázor gént tartalmazza, amely egy indukálható maltóz (*MAL2*) promoter szabályozása alatt áll. A nourseothricin rezisztens transzformánsok analízise után, maltóz tartalmú tápközegben az FLP helyspecifikus rekombinázor képes az *FRT* helyeket felismerni, majd ezeknél fogva az idegen DNS-t a

genomból kivágni, így egy transzformációs kör után újra prototróf organizmushoz juthatunk. Bár *C. albicans* esetén jól működő gendeléciós eljárások régóta rendelkezésre álltak (Fonzi és Irwin 1993), *C. parapsilosis* esetén az első sikeres gén deléciót több, mint tíz évvel később a *caSAT1* flipper rendszer segítségével hajtották végre (Gácsér és mtsai. 2007c).

Tetraciklin által regulált elemek. A tetraciklin által regulált TetR/*tetO* rendszer eredményes rendszernek bizonyult a génexpresszió kontrollálására prokariotákban és eukariotákban egyaránt. Eredetileg az *E. coli*-ban kidolgozott TetR/*tetO* rendszer két komponensből épül fel. Az első komponens a TetR transzaktivátor elem, míg a második a *tetO* operátor régió, amely a tetraciklin rezisztencia gének promoteréből származik. Tetraciklin hiányában a TetR fehérje a tetraciklin operátor *tetO* régióhoz köt, ezáltal meggátolva a fuzionáltatott tetraciklin rezisztens gének kifejeződését. Tetraciklin jelenlétében az antibiotikum a TetR represszorhoz köt és előidézi a disszociációját az operátor régióról (Gossen és mtsai. 1993).

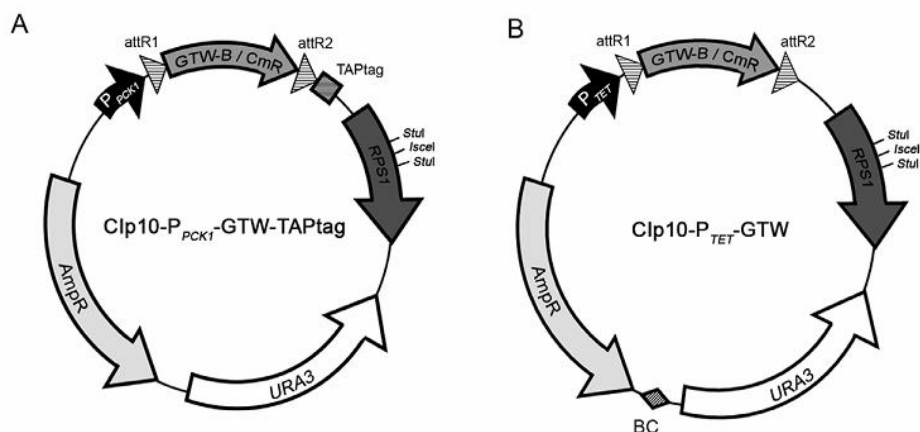
Az első, *Candida* fajokra adaptált, tetraciklin által regulált rendszer kidolgozása 2000-ben történt meg (Nakayama és mtsai. 2000). A kidolgozott rendszer „TET-OFF” néven vonult be a köztudatba. A rendszer az *E. coli*-ban kidolgozott, majd *Candida* fajokra optimalizált TetR elemet tartalmazza, amelyet a Hap4 transzkripciós aktivátor transzaktivátor doménjével (tTA), valamint a TR promoterral fuzionáltattak. A TR promotor élesztő minimál promotert, valamint a tetraciklin operátor régiót (*tetO*) tartalmazza,. A fuzionáltatott transzaktivátor elem (tTA) négy CTG kodonját ez esetben más leucint kódoló tripletre cserélték. Ebben a rendszerben, tetraciklin hiánya esetén a tTA transzaktivátor a *tetO* régióhoz köt, amely lehetővé teszi a vizsgált gén átíródását. A tetraciklin jelenléte meggátolja a tTA kötődését a *tetO* operátor régióhoz, így a vizsgált gén expressziója is megszűnik. A rendszer alkalmazása eredményesnek bizonyult olyan esszenciális gének tanulmányozásához, melyek deléciója nem volt megvalósítható (Yang és mtsai. 2006).

A második, *Candida* fajokban alkalmazott, tetraciklin által regulált rendszer a „TET-ON” rendszer (Park és Morschhauser 2005). A rendszer egy reverz, tetraciklin által szabályozott transzaktivátor elemet (*cartTA*), és a Ptet promotert tartalmazza. A kodon módosított *cartTA* elem a *carTetR* szekvenciát, valamint a *S. cerevisiae* Gal4 aktivátor doménjét tartalmazza. A *carTetR* szekvencia a *TetR* gén kodon módosításából származik, melynek során öt aminosav cseréjére került sor annak érdekében, hogy a tetraciklin által kiváltott hatás ellenkező legyen (Urlinger és mtsai. 2000). A Ptet promoter szekvencia a *C. albicans* *OP4* génjének minimális promoter szekvenciáját, valamint a *tetO* operátor régiót

tartalmazza. Ebben a rendszerben az adott célgén kifejeződése tetraciklin adása során indukálható.

Gén overexpressziós stratégia. Tekintve, hogy a CUG kládba tartozó fajok többsége diploid, szexuális ciklussal nem rendelkező organizmus, egy gén kiütéséhez legalább két transzformálási lépés szükséges, így ez a módszer sok esetben jelentős időt vesz igénybe. Bár az elmúlt évtized során számos *Candida* faj heterozigóta és homozigóta deléciós mutáns törzse készült el, melyek gazdag forrást biztosítanak ezen fajok genetikai, sejtbiológiai és virulencia tanulmányozása során (Noble és Johnson 2007, Gácsér és mtsai. 2007c), ám sok esetben, főleg virulencia faktorokat kódoló gének esetén nem egyéni gének, hanem géncsaládok, vagy több kópiában is előforduló gének vannak jelen a genomban. A funkcionális redundancia miatt egy gén kiütése nem feltétlenül vált ki mérhető fenotipikus változást (Chauvel és mtsai. 2012). *S. cerevisiae* esetén a knock out és az overexpressziós mutáns könyvtárak együttes alkalmazása új szignalizációs utak felderítéséhez vezetett (Jin. 2008). *Candida* fajokban ezidáig *C. albicans*-ban hajtottak végre sikeres gén túlműködtetést. Fu és munkatársai (2008) egy 26 törzsből álló overexpressziós kollektiót hoztak létre, melynek során a célzott gén elé tetraciklin által regulált promotert építettek. Az elkészített overexpressziós mutánsok felhasználásával GPI-vel kihorgonyozott fehérjék szerepét tanulmányozták, melynek során az *IFF4* gén által kódolt fehérje szerepét azonosították, mint fontos faktort a mikroba megtapadása során (Fu és mtsai. 2008). Sahni és munkatársai egy 103 transzkripciós faktort magába foglaló overexpressziós könyvtárat hoztak létre *C. albicans*-ban (Sahni és mtsai. 2010). Az overexpressziós könyvtár létrehozásához tetraciklin indukálható promotert alkalmaztak. A promoterral fuzionáltatott célgént a *C. albicans ADHI* lokuszába integrálták. *C. albicans*-ban a legújabban kidolgozott overexpressziós stratégia kidolgozása során egy újonnan kidolgozott klónozási stratégiát, a Gateway klónozást alkalmazták (Chauvel és mtsai. 2012).

A Gateway klónozás során, ellentétben a hagyományos klónozási lépésekkel a vektorba való integráció helyspecifikus rekombinációval történik. Első lépésként a felszaporított ORF-ek „entry” vektorba való integrációja történik, majd egy második hasonló elven alapuló klónozási lépéssel kerül az ORF egy felhasználásra alkalmas „destination” vektorba. Míg az „entry” vektor csupán a kívánt ORF klónozására szolgál, addig a „destination” vektor a tényleges felhasználást szolgálja, így felépítése a felhasználási területtől függően sokféle lehet (Cabral és mtsai. 2012). Chauvel és munkatársai két „destination” vektort dolgoztak ki *C. albicans* overexpressziós törzsek létrehozásához: Clp10- P_{PCKI} -GTW-TAPtag és Clp10- P_{TET} -GTW (6. ábra).

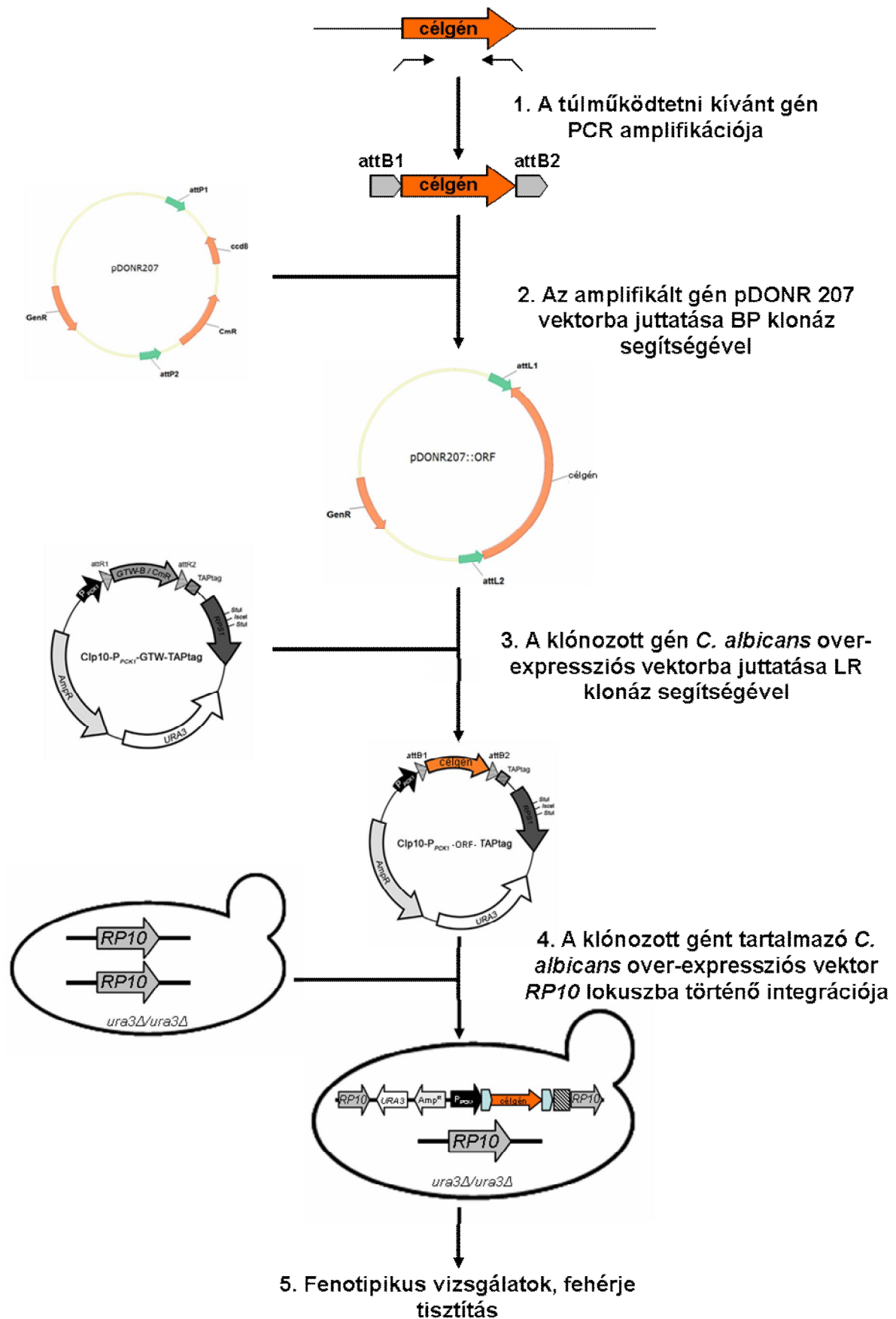


6. ábra

Az overexpressziós stratégiánál alkalmazott Clp10-P_{PCK1}-GTW-TAPtag (A) és Clp10-P_{TET}-GTW (B) destination vektorok (Chauvel és mtsai. 2012).

Mindkét vektor alapját a *C. albicans*-ban használt Clp10 integratív vektor képezi (Murad és mtsai. 2000). A Clp10-P_{PCK1}-GTW-TAPtag vektor egy Gateway kazettát tartalmaz, amelytől 5' irányban a *C. albicans* glükoneogenesis által szabályozott *PCK1* gén promotere helyezkedik el. A Gateway kazettát követően a vektoron a leolvasási keretet megtartva a TAPtag helyezkedik el, amely a túlműködtetett gén termékének affinitás kromatográfiás tisztítását teszi lehetővé. A P_{PCK1} promoter glükóz jelenlétében represszálva van, indukciója kazein hidrolíziséből származó aminosav keverékkel (kazaminosav) lehetséges. A Clp10-P_{TET}-GTW vektor egy tetraciklin indukálható promotert tartalmaz. Az overexpressziós könyvtár létrehozásához a szerzők uracil auxotróf törzset használtak, így az auxotrófia komplementálásához mindkét vektor *URA3* markert hordoz. Az integrációt a *C. albicans* *RP10* lokuszában hajtották végre (7. ábra).

Chauvel és munkatársai munkája során olyan transzkripciós faktorok kerültek túlműködtetésre, melyek a morfogenezisért és növekedési rátáért felelnek. Számos olyan túlműködtetett gént azonosítottak, melyek a morfogenezis szabályozásában vesznek részt és overexpressziós törzseik meghatározott fenotípust mutattak, ellentétben ezen génekre homozigóta deléciós párjaikkal. Ez az eredmény jól mutatja, hogy az overexpressziós mutáns törzsek és megfelelő deléciós mutációval rendelkező párjaik együttes használata eredményesen használható a mikroba regulációs hálózatainak tanulmányozásához.



7. ábra

A Gateway rendszer alkalmazásával létrehozott overexpressziós stratégia (Cabral és mtsai. 2012).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A *C. parapsilosis*-nak napjainkban egyre nagyobb egészségügyi jelentőséget tulajdonítanak. Munkánk elsődleges célja ezért az volt, hogy megvizsgáljuk ezen opportunistá humán patogén élesztő, szekretált aszpartil proteinázainak a virulenciában betöltött szerepét. Elsősorban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon a szekretált aszpartil proteináz deficiens törzsek fenotípusa és virulenciája eltér-e a vad típustól? Tekintettel arra, hogy *C. parapsilosis* esetében a genetikai módosítások eszköztára korlátozott, céljaink között szerepelt, egy erre a fajra optimalizált kísérleti rendszer alapjainak kidolgozása is, amely lehetővé teszi a vizsgálni kívánt gének túlműködtetését.

Hogy a felmerült kérdésekre választ kapjunk, az alábbi célokat tűztük ki:

- (1.) a *C. parapsilosis SAPPI* génjére deléciós mutáns törzs létrehozása, majd a létrehozott mutáns törzs gazda-patogén interakciók során történő vizsgálata, illetve virulenciájának jellemzése;
- (2.) a fent említett *C. parapsilosis SAPPI* génjére deléciós mutáns törzs alkalmazásával a *SAPP2* gén deléciójának kivitelezése, majd az így létrehozott, halmozott deléciót hordozó úgynevezett „sapp negatív” mutáns törzs fenotipikus és virulenciában bekövetkezett változásának jellemzése;
- (3.) egy *C. albicans*-ban jól működő overexpressziós rendszer alapjainak *C. parapsilosis*-ra való adaptálása és annak optimalizálása.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A munkánk során felhasznált mikrobák, előállított deléciós mutáns törzsek és felhasznált primerek

Felhasznált mikroorganizmusok (1. táblázat):

A táblázat a munkánk során felhasznált mikroorganizmusokat tartalmazza

Fajnév	Azonosító kód	Eredet	Genotípus
<i>Candida parapsilosis</i>	GA1	Hamburg (Németország), humán vér	Vad típus
<i>Candida parapsilosis</i>	CLIB 214 leu ⁻	Dublin (Írország) (CLIB 214 vad típus: Puerto Rico, Humán széklet)	<i>leu2Δ::FRT/leu2Δ::FRT</i>
<i>Candida albicans</i>	SC 5314	Princeton (USA), humán vér	Vad típus
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	Sigma	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Sigma	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1	Invitrogen	F ⁻ gyrA462 endA1 Δ(<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr</i> <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>supE44 ara14 galK2</i> <i>lacY1 proA2</i> <i>rpsL20</i> (Sm ^r) <i>xyl5</i> Δ <i>leu</i> <i>mtl1</i>

Előállított mutáns törzsek (2. táblázat):

A táblázat a munkánk során előállított *C. parapsilosis* törzseket tartalmazza

Törzs neve (Rövidítve)	Genotípus
Δ sapp1a NAT ^R	sapp1a Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1a/SAPP1b/SAPP1b
Δ sapp1a NAT ^S	sapp1a Δ ::FRT/SAPP1a/SAPP1b/SAPP1b
Δ/Δ sapp1a NAT ^R	sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1b/SAPP1b
Δ/Δ sapp1a NAT ^S	sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/SAPP1b/SAPP1b
Δ sapp1b NAT ^R	sapp1b Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1b/SAPP1a/SAPP1a
Δ sapp1b NAT ^S	sapp1b Δ ::FRT/SAPP1b/SAPP1a/SAPP1a
Δ/Δ sapp1b NAT ^R	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1a/SAPP1a
Δ/Δ sapp1b NAT ^S	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/SAPP1a/SAPP1a
Δ/Δ sapp1a: Δ sapp1b NAT ^R	sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ :FRT/sapp1b Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1b
Δ/Δ sapp1a: Δ sapp1b NAT ^S	sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/SAPP1b
Δ/Δ sapp1b: Δ sapp1a NAT ^R	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1a
Δ/Δ sapp1b: Δ sapp1a NAT ^S	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/SAPP1a
sapp1 -/- NAT ^R	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT-SAT1-FRT
sapp1 -/- NAT ^S	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT
sapp1 -/-:sapp2 - /- NAT ^R	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp2 Δ ::FR T-SAT1-FRT/sapp2 Δ ::FRT-SAT1-FRT
sapp1 -/-:sapp2 - /- NAT ^S	sapp1b Δ ::FRT/sapp1b Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp1a Δ ::FRT/sapp2 Δ ::FR T/sapp2 Δ ::FRT
CLIB 214 leu- - Fogadó törzs NAT ^R *	leu2 Δ ::FRT/leu2 Δ ::FRT::cprp10 Δ ::FRT-SAT1-FRT-caRP10/cpRP10
CLIB 214 leu- - Fogadó törzs NAT ^S *	leu2 Δ ::FRT/leu2 Δ ::FRT::cprp10 Δ ::FRT-caRP10/cpRP10
CLIB 214 – GFP *	leu2 Δ ::FRT/leu2 Δ ::FRT::cprp10 Δ ::FRT-caRP10::TDH3p- caGFP/cpRP10

*:A létrehozott törzsek a *C. parapsilosis* CLIB 214 leu- auxotróf törzséből készültek el.

Munkánk során felhasznált primerek (3. táblázat):

A táblázat a munkánk során felhasznált primereket tartalmazza.

Primer neve:	Szekvencia (5'→3'):
<i>SAPPIa KpnI</i> Upstream Forward	TTTTTTGGTACCGTCTTCACCCTACCACAAGTGCTATGAG
<i>SAPPIa XhoI</i> Upstream Reverse	TTTTTTCTCGAGGAATTTGTAATTGGTGTTTGTGTCAGCTTTG
<i>SAPPIa NotI</i> Downstream Forward	TTTTTTGCGGCCGCGCTCGTTGGATTATAAACAGTTCAGTTC
<i>SAPPIa SacI</i> Downstream Reverse	TTTTTTGAGCTCGCTTATGTTGTTTATGACTTGGAAGAC
<i>SAPPIb KpnI</i> Upstream Forward	TTTTTTTTGGTACCGTGACAATGTGTTGAGAAATGCTTATG
<i>SAPPIb XhoI</i> Upstream Reverse	TTTTTTTTCTCGAGATTCGGAACATTGCCTCACTCAC
<i>SAPPIb NotI</i> Downstream Forward	TTTTTTTTGCGGCCGCCGAAGGACCTGAAATTTTAAATGACG
<i>SAPPIb SacI</i> Downstream Reverse	TTTTTTTTGAGCTCGAACGGAAGTTTCGATTTAGGCAATAG
<i>SAPP2 KpnI</i> Upstream Forward	TTTTTTGGTACCCCATTCATCATAACCACTTCTTTGGCTG
<i>SAPP2 XhoI</i> Upstream Reverse	TTTTTTCTCGAGAATTGATAGTTGGTGACTTGACATTAACT C
<i>SAPP2 NotI</i> Downstream Forward	TTTTTTGCGGCCGCGTGTTGTTATGAGACAAATCTGTAGTGT AATTG
<i>SAPP2 SacI</i> Downstream Reverse	TTTTTTGAGCTCGCAAACCCGATTCTTCTTAGTGCTG
q <i>Tub4</i> Forward	GAACACTTATGCCGAGGACAAC
q <i>Tub4</i> Reverse	ACTCTCACCCTGACTCCTTGC
q <i>SAPPI</i> Forward	ACTGGACAACAAATTGCAGATG
q <i>SAPPI</i> Reverse	TAAACTGCTTCATTGCTGGTGT
q <i>SAPP2</i> Forward	GTCATATGGGGGATTTGCAC
q <i>SAPP2</i> Reverse	CGCTTTGCTGATGTTACCAG
q <i>SAPP3</i> Forward	CTGGGTCATTGATGCAAATTC
q <i>SAPP3</i> Reverse	AGGTTGAGGTGTCTGGATCG
<i>Cp RP10 KpnI</i> Upstream Forward	TTTTTTTTGGTACCAGAGACTTTCTAAAGGAAAGAAAGGAT TG

<i>Cp RP10 XhoI</i> Upstream Reverse	TTTTTTTTCTCGAGAATGATCTTATTTTGTCTGAGGTGAAAT
<i>Cp RP10 SacI</i> Downstream Forward	TTTTTTTTGAGCTCAAATCAAAAAGACCACTTATGCTCAATC
<i>Cp RP10 SacI</i> Downstream Reverse	TTTTTTTTGAGCTCTTAAACTGATTCCAAAACAACATCCTTG
<i>Ca RP10 NotI</i> Forward	TTTTTTTTGCGGCCGCATATAATCACCAACTCAAGTACAACA TG
<i>Ca RP10 NotI</i> Reverse	TTTTTTTTGCGGCCGCTTCAGTTATCATTATCCTTAAACAGA TTC
<i>Cp WOR1 attB1</i> Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGTCAGCCA CTAACCTAGCTCCTACTTTAC
<i>Cp WOR1 attB2</i> Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGAATCGTTG ACCATGTAAGGATGTAGG
<i>Cd LEU2 NotI</i> Forward	TTTTTTTTGCGGCCGCAGCTCGGATCCACTAGTAACG
<i>Cd LEU2 SpeI</i> Reverse	TTTTTTTTACTAGTACCAGTGTGATGGATATCTGC
<i>Cd LEU2 SacI</i> GTW Forward	TTTTTTTTGAGCTCGCCGCCAGTGTGCTGGAATTC
<i>Cd LEU2 SpeI</i> GTW Reverse	TTTTTTTTACTAGTCCTTACCTACCCATGTCTAGA
<i>qWOR1 Forward</i>	CTGCCACACCAACAACAGCT
<i>qWOR1 Reverse</i>	TGCCATTACCGCTTTGCTGC

5.2. *Candida* transzformációhoz és Southern hibridizációhoz használt reagensek

Transzformációhoz használt oldatok

TB puffer: 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂ * H₂O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂ * 7H₂O, pH = 6,7

10x TE (Tris-EDTA) puffer: 100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5

1x TE (Tris-EDTA) puffer: 10x-es törzsoldatból hígítva

1x TE + 0,1M lítium-acetát puffer (TELIOAC): 1x TE puffer, 0,1 M koncentrációjú lítium-acetáttal kiegészítve pH 7,5

1 M DTT (Ditio-treitol) oldat: 1 M-os oldat, sterilre szűrve

YPD-1M Szorbitol oldat: YPD tápoldat (0,5 % élesztő kivonat, 1 % pepton, 1 % D-glükóz),
1 M szorbit

PLATE oldat: 0,1 M lítium-acetát, 1x TE puffer és 80 %, 50 % PEG 3350 tartalmú oldat

Southern hibridizációhoz használt oldatok:

20x SSC oldat: 0,3 M nátrium-citrát és 3 M NaCl tartalmú oldat

Denaturáló oldat: 2 % NaOH és 8,76 % NaCl tartalmú oldat

Neutralizáló oldat: 0,5 M TRIS (pH 7,5), 8,76 % NaCl és 10^{-3} M EDTA

Hibridizációs puffer: 5x SSC oldat, 0,1 % N-lauril-szarkozin (Sigma), 0,02 % SDS, 1 %
Blocking reagents (Roche)

Mosó oldat (I.): 2x SSC oldat, 0,1 % SDS

20x tömény Mosó oldat (II.): 2x SSC és 2 % SDS

10x tömény 1. Puffer: 1 M maleinsav, 1,5 M NaCl, pH 7,5

2. Puffer: 1% Blocking reagents 1x tömény 1. Pufferben oldva

2. Puffer antitest konjugátummal: 5 ml 2. Puffer 1 µl antitest konjugátummal (Roche)
kiegészítve

3. Puffer: 0,1 M TRIS, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂

NBT/BCIP színreagens (Roche)

5.3. Gateway reakcióhoz használt reagens

1x TE puffer (pH 8,0)

BP clonase II (Invitrogen)

LR clonase II (Invitrogen)

5.4. Bakteriális plazmid tisztításhoz és gomba genomi DNS tisztításhoz használt reagens

Lízis puffer: 50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS pH = 7,5

Alkalikus SDS: 4,4 ml steril desztillált víz, 100 µl 10 M NaOH, 0,5 ml 20 % SDS

High salt: 29,4 g kálium-acetát, 11,5 ml ecetsav, 28,5 ml steril desztillált víz

Lízis puffer élesztő genomi DNS tisztításhoz: 1 % SDS, 50 mM EDTA, 100 mM TRIS
pH = 8

7 M-os ammónium – acetát

5.5. Fagocitózis vizsgálathoz alkalmazott reagentsek

FITC-puffer: 100 mM NaCl, 50 mM NaHCO₃

FACS puffer: 0,5 % FBS 1 x-es PBS-ben

5.6. Scanning elektronmikroszkópiához használt reagens

Sorenson-puffer: 0,133 M Na₂HPO₄, 0,133 M KH₂PO₄ pH = 7,5

5.7. Tenyésztéshez használt táptalajok, tápoldatok

YPD táptalaj, tápoldat: 0,5 % élesztő kivonatot, 1 % peptont és 1 % D-glükóz. Táptalaj készítéséhez a táplevest 2,5 % agarral egészítettük ki. A bakteriális kontamináció elkerülése érdekében a tápoldathoz és a táptalajhoz, azok megfelelő hőmérsékletűre hűlését követően, 1 % penicillin-sztreptomycin (Sigma) oldatot adtunk (YPD-PS).

YPD-NAT táptalaj, tápoldat: A deléciós transzformánsok előállítása során az YPD-PS tápoldat/táptalaj 100 ml-ét 100 µl mennyiségű, 100 mg/ml koncentrációjú nourseotricin (clonNAT, Werner Bioagents) oldattal egészítettük ki a transzformáns telepek szelekciójának érdekében. A domináns szelekciós marker kivágódása után az újonnan NAT szenzitívvé váló telepeket szubletális mennyiséget tartalmazó (0,5 µl NAT/ 100 ml YPD) csészén szelektáltuk.

Minimál táptalaj: 0,95 % élesztő nitrogén bázis, 2 % glükóz, 2,5 % agar, 10 % 10x drop-out médium.

Drop-out médium (10x tözsoldat): 0,02 % arginin, 0,03 % izoleucin, 0,03 % lizin, 0,02 % metionin, 0,05 % fenilalanin, 0,2 % treonin, 0,03 % tirozin, 0,02 % uracil, 0,15 % valin, 0,2 % adenin, 0,2 % triptofán.

LB táptalaj, tápoldat: 0,5 % élesztő kivonatot, 1 % tripton és 1 % nátrium-klorid. Táptalaj készítéséhez a táplevest 2,5 % agarral egészítettük ki. *E. coli* XL1-Blue és DH5α törzsek transzformációja során az LB táptalaj/tápoldat 100 ml-ét 200 µl mennyiségű, 50 mg/ml koncentrációjú ampicillin (Sigma), illetve 200 µl 50 mg/ml koncentrációjú kanamicin (Sigma)

antibiotikummal egészítettük ki (LB^{AMP} / LB^{CHL}). *E. coli* DB 3.1 törzs transzformációja során az LB táptalaj/tápcolat 100 ml-ét 200 µl 50 mg/ml koncentrációjú kanamicin (Sigma), illetve 200 µl mennyiségű, 50 mg/ml koncentrációjú ampicillin (Sigma), valamint 34 µl 34 mg/ml koncentrációjú kloramfenikol (Sigma) oldattal egészítettük ki ($LB^{KAN+CHL} / LB^{AMP+CHL}$).

SOB tápcolat: 2 % tripton, 0,5 % élesztő kivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$, melynek pH-ját 6,7 értékre állítottuk be 5 M KOH oldattal.

PBMC tápcolat: A humán mononukleáris sejteket 1 % penicillin-szterptomicin oldatot (Sigma), és 10 % hőinaktivált humán szérumot (Lonza) tartalmazó vagy szérummentes RPMI 1640 tápcolatban (Lonza) tenyésztettük.

PBMC-DM tápcolat: Primer makrofágok differenciálathoz a mononukleáris sejteket 1 % penicillin-szterptomicin oldatot és 10 ng/ml koncentrációjú granulocita-monocita kolónia stimuláló faktort (GM-CSF, Sigma) tartalmazó X-VIVO (Lonza) tápcolatban tenyésztettük.

YNB-Maltóz tápcolat: A deléciós transzformánsok létrehozása során a domináns szelekciós nourseotricin marker kirekombinálódására szolgáló tápcolat 1x-es töménységű élesztő nitrogén bázist (yeast nitrogen base, YNB (Sigma)), valamint 2 % maltózt tartalmazott. A tápcolatot 1 % penicillin-szterptomicin oldattal (Sigma) egészítettük ki.

YCB-BSA tápcolat: A szekretált aszpartil proteinázok termelődését elősegítő indukciós tápcolat 1x-es töménységű élesztő-szénbázis (yeast carbon base, YCB (Sigma)), valamint 2 % borjú szérum albumint (bovine serum albumine, BSA (Sigma) tartalmazott, melyet 1 % penicillin-szterptomicin oldattal (Sigma) egészítettünk ki.

Proteináz aktivitás kimutatására szolgáló táptalaj: A szekretált savas proteinázok szemikvantitatív kimutatására szolgáló táptalaj 1x-es töménységű YCB-t, valamint 0,2 % BSA-t tartalmazott, melyet 2,5 % agarral és a megfelelő hőmérsékletre hűlést követően 1 % penicillin-szterptomicin oldattal (Sigma) egészítettünk ki.

5.8. Tenyésztési körülmények

Candida törzsek fenntartása: Az élesztő törzseket YPD-PS, valamint YPD-NAT táptalajon tartottuk fenn, kéthavonta frissítettük, 2 napig 30 °C-on inkubáltuk, ezt követően 4 °C-os hűtőben tároltuk. A létrehozott törzsek hosszú távú tárolását 20% glicerinnel kiegészített YPD-PS illetve YPD-NAT tápoldatban végezzük -80 °C hőmérsékleten.

Candida törzsek tenyésztése: Az élesztőket transzformációs kísérletekhez 100 ml YPD-PS tápoldatban szaporítottuk fel. A leoltott mikrobákat 30 °C-on, 200 rpm fordulatszámmal egy éjszakán át rázattuk. Egyéb vizsgálatokhoz a törzseket 2 ml YPD-PS tápoldatban szaporítottuk fel, szintén 30 °C-on, 200-as fordulatszám mellett egy éjszakán keresztül rázatva.

5.9. Primer sejtek izolálása

PBMC-k izolálása és differenciálata: A perifériás vérből származó mononukleáris sejteket (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) egészséges felnőtt donorok véréből előállított vérkészítményből („buffy coat”) izoláltuk Ficoll Paque Plus (GE Healthcare) sűrűség gradiens centrifugálással (175 g, 30 perc, 4 °C). A PBMC frakciót összegyűjtöttük, kétszer PBS-sel mostuk, majd a vörösvértestek eltávolítása érdekében ACK lízis pufferrel (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA) kezeltük és ismételten centrifugáltuk (220 g, 10 perc). A sejteket szérummentes PBMC tápoldatban vettük fel, majd a felhasználás módjától függően 12, 24 vagy 96 mintahelyes tenyésztőedénybe pipettáztuk őket, és két órán keresztül inkubáltuk (37 °C, 100 % relatív páratartalom, 5 % CO₂ tenzió). Ezután az úszó sejteket eltávolítottuk, a tenyésztőedény aljához letapadt monocitákat előmelegített 1x-es PBS-sel mostuk, és a mintahelyekbe megfelelő mennyiségű PBMC-DM tápoldatot adtunk. A sejteket 7 napon keresztül inkubáltuk (37 °C, 100 % relatív páratartalom, 5 % CO₂ tenzió) a tápoldat 2 naponkénti cseréjével.

5.10. Kompetens sejtek készítése

Kompetens *E. coli* sejtek készítése: Kompetens *E. coli* sejt készítéséhez egy telepnyi XL1-Blue/DH5α/DB 3.1 *E.coli* inokulumot 25 ml, 10 µg/ml tetraciklin tartalmú LB tápoldatba oltottunk, majd hozzávetőlegesen 8 órán keresztül 37 °C-on 250 rpm rázatással növesztettünk. Az így felnövesztett starter tenyészetből 15 ml-t 250 ml SOB tápoldatba átoltottunk, majd 16

°C-on 175 rpm rázatás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap, amennyiben a kultúra az OD = 0,4 értéket elérte, a kultúrát 4 °C-on 5000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A sejteket 80 ml TB pufferben felfuszpendáltuk, majd 8 % Dimetil-szulfoxidot (DMSO) (Sigma) adtunk hozzá. Az így elkészített szuszpenziót 100 µl-es adagokban folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítése elektroporációhoz: Kompetens *C. parapsilosis* sejt készítéséhez egy kacsnyi inokulumot 100 ml YPD-PS tápoldatba oltottunk, majd 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap az ily módon felnövesztett kultúrát 2 darab 50 ml-es Falcon-csőbe szétöntve 4 °C-on, 3000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A leülepített sejteket 50 ml TE pufferben felfuszpendáltuk, újra centrifugáltuk, majd következő lépésben 30 ml 1x TE + 0,1 M lítium-acetát (Sigma) pufferben felfuszpendáltuk, majd 45 percig 30 °C-on 200 rpm mellett ráztuk. Az inkubációs idő letelte után 750 µl 1 M koncentrációjú ditiotritol (DTT) oldatot adtunk a szuszpenzióhoz, majd további 15 percig az előbb említett körülmények közt ráztuk a szuszpenziót. Az inkubációs idő letelte után a szuszpenziót hideg steril desztillált vízzel 50 ml-re egészítettük ki és 4 °C-on, 3000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A sejteket ezután kétszer jéghideg steril desztillált vízzel, majd utolsó lépésként szintén jéghideg 1 M koncentrációjú szorbitol oldattal mostuk. Az így elkészített kompetens sejteket felhasználásig jégen tároltuk.

5.11. Kompetens sejtek transzformálása

Kompetens *E. coli* sejtek transzformálása: A -80 °C-on tárolt kompetens sejtekből 100 µl szuszpenziót 10 percig jégen inkubáltunk. 10 perc után a sejtekhez pipettáztuk a transzformálni kívánt DNS-t, majd további 25 percig az elegyet jégen tároltuk. Az inkubációs idő után a sejteket 42 °C-os hőszekrének vetettük alá 2 percig, majd 800 µl LB tápoldatot pipettáztunk rájuk. A sejteket ezután 37 °C-on 40 percig inkubáltuk, majd szelektív LB táptalajra szétosztottuk, a megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve. A csészéket egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

***C. parapsilosis* sejtek transzformálása - elektroporáció:** A „Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítése” alfejezetben leírt módon előállított sejtek 40 µl-éhez 5 µg mennyiségű transzformáló DNS-t adtunk, majd 0,2 cm átmérőjű, hűtött elektroporáló küvettába (Bio Rad)

tettük, transzformálásig jégen tároltuk. Az elektroporáció paraméterei: 1,5 kV, 25 μ F, 200 Ω voltak. Az elektroporáció után a sejtekhez 800 μ l 1 M szorbitollal kiegészített YPD-PS tápoldatot adtunk, majd az elegyet 2 ml, 1 M szorbitollal kiegészített YPD-PS tápoldatba pipettáztuk, majd 3 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a sejteket centrifugáltuk (4 °C, 3000 rpm, 5 perc), 200 μ l 1 M szorbitollal kiegészített YPD-PS tápoldatban felszuszpendáltuk, majd YPD-NAT csészére szélesztettük. A transzformáns telepeket hordozó csészéket 2 napig 30 °C-on inkubáltuk. A transzformálandó deléciós konstrukciók 5 μ g mennyiségét 200 μ l végtérfogatban *KpnI*- *SacI* egy éjszakán át tartó kettős emésztéssel kezeltük. Ellenőrzésként az emésztési elegy 3 μ l-ét 0,8 %-os TAE gélben megfuttattuk, a maradék mennyiséget izopropanol (13000 rpm, 10 perc) és etanol (13000 rpm, 5 perc) segítségével csaptuk ki, majd 5 μ l steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel.

***C. parapsilosis* sejtek transzformálása – kémiai transzformálás:** A *C. parapsilosis* sejteket egy éjszakán át 5 ml mennyiségű YPD tápoldatban, 30 °C-on, egy éjszakán át 200 rpm rázatás mellett növesztettük. Másnap ezen starter kultúra 500 μ l-ét 30 ml YPD tápoldatba oltottuk át, majd OD = 1,0 értékig növesztettük (~4 óra). A tenyészetet ezután centrifugáltuk (3000 rpm, 4 °C, 5 perc), majd 3 ml jéghideg desztillált vízzel mostuk. A szuszpenziót ezután 1 ml jéghideg TELOAC pufferben mostuk, majd 200 μ l TELIOAC pufferben szuszpendáltuk fel. A szuszpenzió 100 μ l-éhez 10 μ l 10 mg/ml koncentrációjú hering sperma DNS-t (Sigma) adtunk (a hering sperma DNS-t 10 perces forralással denaturáltuk, majd jégen tároltuk), valamint a transzformáló DNS 20 μ l-ét adtuk az elegyhez. Az elegyet 30 percen keresztül 30 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után 700 μ l PLATE oldatot adtunk az elegyhez, majd 30 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Másnap az elegyet 44 °C-on 15 percig inkubáltuk, majd 13000 rpm fordulattal 30 másodpercig centrifugáltuk. 1 ml YPD oldattal mostuk a sejteket (a pellet felkeverése nélkül), majd 100 μ l YPD tápoldatban szuszpendáltuk fel azokat. 2 órán keresztül 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett inkubáltuk, majd minimál táptalajra szélesztettük a sejteket, melyeket 30 °C-on 2 napig inkubáltunk. A transzformálni kívánt konstrukciók 10 μ g mennyiségét 200 μ l végtérfogatban *StuI* enzimmel egy éjszakán át tartó emésztéssel kezeltük. Ellenőrzésként az emésztési elegy 3 μ l-ét 0,8 %-os TAE gélben megfuttattuk, a maradék mennyiséget izopropanol (13000 rpm, 10 perc) és etanol (13000 rpm, 5 perc) segítségével csaptuk ki, majd 20 μ l steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel.

5.12. Vektorok létrehozása

Deléciók konstrukciók létrehozása: A *SAPP1a* lokusz deléciójának végrehajtásához a pSFS2Sapp1a, a *SAPP1b* lokusz deléciójának végrehajtásához a pSFS2Sapp1b, míg a *SAPP2* lokusz deléciójának végrehajtásához a pSFS2Sapp2 vektorokat használtuk fel.

A pSFS2Sapp1a konstrukció elkészítéséhez 648 bp méretű upstream homológ szekvenciát, valamint 721 bp méretű downstream homológ szekvenciát szaporítottunk fel a *C. parapsilosis* GA1 genomi DNS-ét templátként felhasználva. Az upstream homológ régió felszaporításához a *SAPP1a KpnI* upstream forward és a *SAPP1a XhoI* upstream reverse, valamint a downstream homológ régió felszaporításához a *SAPP1a NotI* downstream forward, és a *SAPP1a SacI* downstream reverse primer párokat használtuk (3. táblázat).

A pSFS2Sapp1b konstrukció elkészítéséhez 614 bp méretű upstream és 386 bp méretű downstream homológ szekvenciát amplifikáltunk a *C. parapsilosis* GA1 genomi DNS-ét templátként felhasználva. Az upstream homológ régió felszaporításához a *SAPP1b KpnI* upstream forward és a *SAPP1b XhoI* upstream reverse, valamint a downstream homológ régió felszaporításához a *SAPP1b NotI* downstream forward, és a *SAPP1b SacI* downstream reverse primer párokat használtuk (3. táblázat).

A pSFS2Sapp2 konstrukció elkészítéséhez 260 bp nagyságú upstream és 223 bp nagyságú downstream homológ szekvenciát amplifikáltunk a *C. parapsilosis* GA1 genomi DNS-ét templátként felhasználva. Az upstream homológ régió felszaporításához a *SAPP2 KpnI* upstream forward és a *SAPP2 XhoI* upstream reverse valamint a downstream homológ régió felszaporításához a *SAPP2 NotI* downstream forward és a *SAPP2 SacI* downstream reverse primer párokat használtuk (3. táblázat).

Az amplifikáció után az upstream homológ régiót valamint az üres pSFS2 vektort *KpnI* – *XhoI*, a downstream homológ régiót valamint az üres pSFS2 vektort *NotI* – *SacI* 37 °C-on egy éjszakán át tartó emésztésnek vetettük alá. Az emésztett fragmentumokat gélből való visszaizolálást követően *KpnI* – *XhoI*, valamint *NotI* – *SacI* helyekre klónoztuk.

***C. parapsilosis* fogadó törzsének létrehozásához használt konstrukció létrehozása:** A *C. parapsilosis* fogadó törzsének létrehozásához a CLIB 214 leu⁻ auxotróf törzset használtuk fel. Ezen törzs genomi DNS-éből az *RP10* lokusz upstream részének 319 bp méretű szakaszát a *Cp RP10 KpnI* upstream forward és *Cp RP10 XhoI* upstream reverse primerek segítségével, valamint ugyanezen lokusz downstream részének 326 bp méretű szakaszát a *Cp RP10 SacI* downstream forward és *Cp RP10 SacI* downstream reverse primerek segítségével

amplifikáltuk. A *C. albicans* *RP10* lokuszát (770 bp) a *Ca* *RP10* *NotI* forward és a *Ca* *RP10* *NotI* reverse primerekkel amplifikáltuk (3. táblázat).

Az amplifikáció után a fragmentumokat a megfelelő enzimek használatával (*C. parapsilosis* *RP10* upstream régió esetén: *KpnI* és *XhoI*, *C. parapsilosis* *RP10* downstream régió esetén: *SacI*, *C. albicans* *RP10* régió esetén: *NotI*) az üres pSFS2 vektorba klónoztuk.

GFP konstrukció létrehozása: A pSN40 vektort alkalmazva a vektorról a *C. dubliniensis* *LEU2* markerét a *Cd* *LEU2* *NotI* forward és *Cd* *LEU2* *SpeI* reverse primerek segítségével amplifikáltuk (3. táblázat). A kapott fragmentumot *NotI* és *SpeI* enzimekkel emésztettük, valamint ugyanezen enzimekkel a Clp10-pTDH3-GFP konstrukció *URA3* markerét kivágtuk. Az emésztett, *URA3* markert már nem hordozó Clp10-pTDH3-GFP vektorba a megemésztett *C. dubliniensis* *LEU2* markert *NotI* és *SpeI* helyekre klónoztuk.

Gateway destination vektor létrehozása: A pSN40 vektort alkalmazva a vektorról a *C. dubliniensis* *LEU2* markerét a *Cd* *LEU2* *SacI* GTW forward és a *Cd* *LEU2* *SpeI* GTW reverse primerek segítségével amplifikáltuk (3. táblázat), majd a *SacI* és *SpeI* enzimekkel emésztettük. A pTDH3-GTW vektorból *SacI* és *SpeI* kettős emésztéssel az *URA3* markert kivágtuk, majd az emésztett vektorba az emésztett *LEU2* markert klónoztuk, a *SacI* és *SpeI* helyek felhasználásával.

5.13. Gateway reakciók

A gateway reakcióhoz alkalmazni kívánt *WOR1* open reading frame-t a *C. parapsilosis* CLIB 214 leu- törzsének genomi DNS-éből, a *Cp* *WOR1* attB1 forward és a *Cp* *WOR1* attB2 reverse primerpárok segítségével szaporítottuk fel. A BP és LR klonáz reakciókhoz az Invitrogen BP Clonase II és LR Clonase II kiteket használtuk.

BP klonáz reakció: Az entry klón létrehozásához a felszaporított ORF és a pDONR 221 vektor segítségével BP reakciót hajtottunk végre. A BP reakció során a felszaporított ORF végein megtalálható attB1 és attB2 helyek és a vektoron megtalálható attP1 és attP2 helyek között játszódik le a rekombináció, melynek során a felszaporított ORF a vektorba beépül. A reakciót 10 µl végtérfogatban mértük össze. A reakcióhoz 1 µl 150 ng/µl koncentrációjú pDONR 221 vektort, 2 µl 100 ng/µl koncentrációjú PCR terméket, 2 µl BP Clonase II reakció mixet és 5 µl 1x TE puffert (pH = 8,0) adtunk. A reakciót 25 °C-on egy éjszakán át végeztük. Másnap 2 µl Proteináz K oldatot adtunk az elegyhez, melyet 37 °C-on 10 percig inkubáltuk.

Az inkubációs idő után az elegyet *E. coli* DH5 α sejtekbe transzformáltuk, majd LB^{CHL} csészékre szélesztettük.

LR klonáz reakció: A BP clonase reakció által létrehozott entry klón segítségével LR reakciót végeztünk el. Az LR reakció során az entry klónban megtalálható attL1 és attL2 helyek és a destination vektoron megtalálható attR1 és attR2 helyek között játszódik le a rekombináció, melynek során az entry klónba épített ORF a destination vektorba épül. Az LR reakciót szintén 10 μ l végtérfogatban mértük össze, az alábbiak szerint: 1 μ l 100 ng/ μ l koncentrációjú entry klón, 1 μ l 100 ng/ μ l koncentrációjú pTDH3-GTW-LEU2 destination vektor, 2 μ l LR Clonase II reakció mix és 5 μ l 1x TE puffer (pH = 8,0). A reakciót 25 °C-on overnight végeztük. Másnap 2 μ l Proteináz K oldatot adtunk az elegyhez, melyet 37 °C-on 10 percig inkubáltuk. Az inkubációs idő után az elegyet *E. coli* DH5 α sejtekbe transzformáltuk, majd LB^{AMP} csészékre szélesztettük. Mindkét reakció esetén a jó klónokat restrikciós fragment hossz alapján azonosítottuk.

Polimeráz láncreakció: Valamennyi PCR-t a Roche Expand long template PCR System polimerase kit-tel végeztünk. Egyetlen 25 μ l végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x Roche Expand Long Template Buffer 1. (gyárilag 20 mM MgCl₂-vel), 0,25-0,25 μ M forward és reverse primer, 0,2-0,2 mM dNTPs (Sigma), 20-50 ng genomi DNS templát és 1 unit Expand Long Template Enzyme Mix. A fenti reakcióelegyet az alábbi körülmények között inkubáltuk: 3 perc, 95 °C predenaturáció, majd 35 cikluson keresztül 1 perc, 94 °C, 0:45 perc 60 °C és 2 perc 68 °C végül 7 perc, 68 °C utópolimerizáció.

5.14. Bakteriális plazmid, gomba genomi DNS és gomba RNS tisztítása

Bakteriális plazmid tisztítása: A „Kompetens *E. coli* sejtek transzformálása” pontban leírt, 37 °C-on felnövesztett transzformáns telepeket 2 ml antibiotikummal kiegészített LB tápfolyadékba oltottunk, majd egy éjszakán át 200 rpm-en 37 °C-on ráztattuk. Az ily módon felnövesztett tenyészeteket másnap 1,5 ml-es Eppendorf csőbe pipettáztuk, 6000 rpm-en 5 percig üleptettük. A kiüleptített sejteket 100 μ l lízis pufferben felszuszpendáltuk, majd 5 percig állni hagytuk. Öt perc után 200 μ l alkalikus SDS-t, majd 150 μ l high salt oldatot adtunk, amely után 15 percig jégen inkubáltuk az elegyet. Ezután 0,5 ml kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú elegyét adtuk hozzá, 13000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A felső fázisban levő DNS-t izopropanollal (13000 rpm 10 perc), majd 70 %-os etanollal (13000 rpm 5 perc)

csaptuk ki. A megszáritott plazmid DNS-t 30 µl RNáz tartalmú steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel. A plazmidok ellenőrzése restrikciós emésztési mintázatuk alapján történt.

Nagyobb mennyiségű plazmid izolálása érdekében a transzformáns telepet 100 ml térfogatú megfelelő antibiotikummal kiegészített LB tápfolyadékba oltottuk, egy éjszakára 200 rpm-en 37 °C-on ráztattuk. Másnap a bakteriális plazmid tisztítását a Geneaid Plasmid Midi Kit segítségével, a gyártó utasításai szerint végeztük.

Genomi DNS kivonás gombából: A törzseket 2 ml YPD-PS tápoldatban ráztattuk (200 rpm) 30 °C-on (*C. albicans* esetén 37 °C-on) egy éjszakán át. A sejteket 3000 rpm fordulaton 5 percig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, majd 500 µl lízis puffert (1 % SDS, 50 mM EDTA, 100 mM TRIS pH = 8) és 500 µl üveggyöngyöt mértünk a mintákra, amelyeket ezután 3 percen keresztül vortexeltük. A mintákhoz 275 µl 7 M-os ammónium-acetátot adtunk és 5 percig 65 °C-on inkubáltuk, majd 5 percre jégre helyeztük őket. A mintákat 500 µl kloroform-izoamilalkohol (24:1) hozzáadását követően centrifugáltuk (10 perc 13000 rpm). A felső, vizes fázist átpipettáztuk egy másik csőbe, amelyhez 500 µl izopropanolt adtunk, és 5 percre -20 °C-ra helyeztünk. Az oldatot centrifugáltuk (10 perc, 13000 rpm), a felülúszót eltávolítottuk, a kiülepedett csapadékra 70 %-os etanolt mértünk, majd a mintákat a fenti paraméterekkel újból centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a mintákat beszárítottuk és 100 µl RN-ázos (Sigma) bidesztillált vízben vettük fel. A kivonás sikerességének ellenőrzésére a mintákból 1-1 µl-t futtattunk meg 0,8 %-os agaróz gélen.

Southern hibridizáció: A genomi DNS-t a „DNS kivonás gombából” fejezetben leírtak alapján izoláltuk, és a következő restrikciós enzimekkel egy éjszakán át emésztettük (Fermentas): *Cla*I – *Bam*HI (*SAPPIa* lokusz deléciója), *Eco*RI (*SAPPIb* és *SAPP2* lokusz deléciója), a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS-t izopropanolal csaptuk ki és 70 %-os etanollal mostuk (13000 rpm, 10 perc). A mintákat 0,8 % agaróz gélen futtattuk DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker VII (Roche) mellett. A fragmenteket filterre (Amersham Hybond-N (GE Healthcare)) blottoltuk és UV fénnel kovalensen rögzítettük. A további lépéseket a Gottschling Lab (Fred Hutchinson Cancer Research Center) Southern-hibridizációs protokollja szerint végeztük (<http://labs.fhrc.org/gottschling/General%20Protocols/southerns.html>). A hibridizációt egy éjszakán át végeztük 65 °C-on a „DIG-dUTP jelölt próbák előállítása” pontban leírt jelölt próbákkal. Hogy a fragmenteket láthatóvá tegyük a filtert Anti-digoxigenin-AP Fab fragmenttel (Roche) és NBT/BCIP színreagenssel (Roche) kezeltük.

DIG-dUTP jelölt próbák előállítása: A DIG-jelölt próba elkészítéséhez DreamTaq DNS polimeráz kit-et (Fermentas) használtunk a gyártó által javasolt protokoll szerint. A dNTP mixet Fermentas dNTP és Digoxigenin-11-dUTP (Roche) felhasználásával állítottuk össze. A reakciótérfogat 30 µl volt. A PCR program az alábbi lépéseket tartalmazta: 3 perc elődenaturáció 95 °C-on, majd 35 cikluson keresztül: 45 másodperc, 94 °C-on, 15 másodperc, 60 °C-on, 2 perc, 72 °C-on, végül utópolimerizáció 7 percig, 72 °C-on. A *SAPP1a* lokusz detektálásához a lokusz upstream *KpnI* forward és *XhoI* reverse homológ régióinak primer párját, a *SAPP1b* lokusz detektálásához a lokusz downstream *NotI* forward és *SacI* reverse homológ régiójának primer párját, míg a *SAPP2* lokusz detektálásához a lokusz downstream *NotI* forward és *SacI* reverse homológ régiójának primer párját jelöltük.

A deléciós kazetta eliminálása a genomból: A helyes integrációt hordozó transzformánsokat 1x YNB + 2 % maltóz tartalmú tápoldatba oltottuk, egy éjszakán át 30 °C-on 200 rpm mellett rázattuk. Másnap a sejtkoncentrációt 4000 sejt/ml számra állítottuk be, majd szubletális mennyiséget (0,5 µg/ml) tartalmazó YPD-NAT csészére szélesztettünk 50 µl mennyiséget. A csészéket 2 napig 30 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a kinőtt kis telepeket YPD csészékre gyűjtöttük, melyeket hasonló időtartamig hasonló hőmérsékleten inkubáltunk. A kinőtt telepeket YPD-NAT csészékre is átoztottuk, majd szintén hasonló paraméterek mellett inkubáltuk. Az YPD-NAT csészén nőni képtelen telepeket összegyűjtöttük, majd Southern hibridizáció segítségével ellenőriztük a deléciós kazetta eltűnését a genomból.

RNS kivonás gomba sejtekből: A szekretált savas proteinázok transzkripció vizsgálatához a vad típusú és transzformáns törzseket 2 ml YPD tápfolyadékban 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett, egy éjszakán át tenyésztettük. Másnap a sejteket kétszer mostuk 1x PBS-ben, majd 2 ml 1x YCB + 2 % BSA tápfolyadékban vettük fel őket. A szuszpenziót szintén 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett, egy éjszakán át tenyésztettük. Másnap a gomba RNS kivonását a Quiagen RNeasy Plant Mini Plus Kit segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. A folyamat során DNáz kezelést végeztünk 30 percen keresztül, melyhez Quiagen RNase-Free DNase Set-et használtunk.

RNS minőség/mennyiség ellenőrzés: Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop -, a minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer készülékek segítségével határoztuk meg.

cDNS szintézis: A reverz transzkripcióhoz Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Minden reakcióban 0,5-0,5 µl oligodT és random hexamer primereket alkalmaztunk. A szintézis során hozzátétőlegesen 1 µg, vagy ha a koncentráció túl alacsony volt, akkor a maximális 12 µl RNS templátot használtuk. A reakció lépései: 25 °C, 5 perc majd 42 °C, 60 perc végül 70 °C, 5 perc.

Valós idejű kvantitatív PCR (qRT-PCR): A reakcióhoz a reverz transzkripció termékéből 1 µg mennyiségű templát 10x-es hígításának 1 µl-ét használtunk. Fermentas Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2x) kit-tel dolgoztunk. A reakciót 20 µl végtérfogatban végeztük, így a gyártó által mellékelt protokollban szereplő mennyiségeket is ezzel arányosan csökkentettük. A reakciókat Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler gépben futtattuk le a következő kondíciókkal: 95 °C, 3 perc, majd 50 cikluson keresztül 95 °C, 10 másodperc majd 60 °C, 30 másodperc. A fluoreszcencia intenzitásának mérése minden ciklus végén történt. Az utolsó ciklust követően a termékek olvadási görbéit is megvizsgáltuk 65 - 95 °C-os tartományban 0,5 °C-os lépésekkel. A relatív expressziós értékek kiszámítása a $\Delta\Delta C_{(t)}$ eljárással történt, amelyhez a berendezés saját szoftverét használtuk. Valamennyi mintát három technikai párhuzamosban mértünk le. Gomba esetén az α -tubulin szolgált belső kontrollként.

5.15. Proteináz aktivitás mérése

Szekretált Proteináz aktivitás detektálása: A vad típusú és deléciós mutáns törzseket 2 ml YPD tápoldatban egy éjszakán át 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett tenyésztettük. Másnap a törzseket kétszer steril desztillált vízzel mostuk, majd a sejtszámot 10^8 /ml koncentrációjúra állítottuk be. Ebből a sejtszuszpenzióból 10 µl térfogatot proteináz aktivitás kimutatására szolgáló csészére (5.6. fejezet) cseppentettünk, majd beszárítottuk. A csészéket 2 napig 30 °C-on inkubáltuk, majd amidoblack festékkel festettük. A festék mosását metanol-ecetsav-víz 3:1:6 arányú elegyével végeztük. A feltisztulási zóna nagyságát ImageJ programmal analizáltuk.

Sapp1 és Sapp2 fehérjék aktivitásának kvantitatív mérése fluoreszcens szubsztrát felhasználásával: A Sapp1 és Sapp2 fehérjék aktivitásának méréséhez a vad típusú és deléciós törzseket egy éjszakán át 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett 50 ml 1x YCB + 2% BSA tápoldatban tenyésztettük. A tenyészeteket másnap centrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc), majd a

felülűszót 0,45 µm pórusméretű Millex HV filter (Millipore) segítségével sterilre szűrtük. A felülűszót ezután 2 ml térfogatra töményítettük (4000 g 30 perc), 10 kDa Amicon Ultra -15 filter segítségével. Az enzimaktivitás detektálásához a Dabcyl-Glu-His-Val-Lys-Leu-Val-Glu-EDANS fluoreszcens szubsztrátot használtuk fel (5 mg/ml, DMSO-ban oldva) , melyet Olga Hruskova-Heidingsfeldova csoportja bocsátott rendelkezésünkre.

A Sapp1 és Sapp2 fehérjék proteolitikus reakciója 150 µl végtérfogatban történt, amely 5 µl fluoreszcens szubsztrát törzsoldatot, 20 µl koncentrált felülűszót (kontrollként tisztított Sapp1 fehérjét, 0,05 mg/ml) tartalmazott. A tisztított Sapp1 fehérjét szintén Olga Hruskova-Heidingsfeldova csoportja bocsátotta rendelkezésünkre. A reakciót 100 mM nátrium-acetát pufferrel (Ph = 3,75) egészítettük ki 150 µl-re, majd sötétben 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A reakció leállítását 20 µl 20 % trifluor-ecetsavval (TFA) végeztük. A HPLC analízis körülményei a következők voltak: Phenomenex Prodigy c18 250*4.6 5 mikron-os oszlop, „A” eluens: víz+0,1% trifluor ecetsav, „B” eluens: acetonitril+0.1% trifluor ecetsav, áramlási sebesség: 1ml/perc, oszlop hőmérséklete: 30°C, gerjesztési hullámhossz: 360 nm, emissziós hullámhossz: 480 nm. A kiértékelést végző szoftver: Shimadzu CLASS-VP 5.032.

5.16. Virulencia vizsgálatok

Szérumerzékenység vizsgálata: A vad típusú, valamint a *Δsapp1a*, *Δsapp1b*, *Δsapp1a-Δsapp1b* valamint a *Δsapp1a-Δsapp1b-Δsapp2* törzseket YPD-PS tápoldatban 30 °C-on, 200 rpm rázatás mellett egy éjszakán át tenyésztettük. Másnap a törzseket 1x PBS-ben mostuk, majd 5-5 ml 20 % intakt, vagy hővel inaktivált (56 °C, 30 perc) humán szérum tartalmú, 1x PBS-el kiegészített tápközegbe oltottuk a törzseket, $1,5 \cdot 10^5$ -es sejtszámban. A törzseket ezután 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett inkubáltuk. 0, 8, 12, 24 és 48 óra után mintát vettünk a tenyészetekből, melyeket a megfelelő hígítás mellett YPD-PS táptalajra szélesztettünk. A csészéket 2 napig 30 °C-on inkubáltuk, majd CFU meghatározást végeztünk.

Ölési hatások meghatározása: A PBMC illetve ezekből differenciáltatott primer makrofág sejteket 96 mintahelyes tenyésztőedényben fertőztük *C. parapsilosis* GA1 vad típusú valamint deléciós törzsekkel 1:5 arányban, három technikai párhuzamost alkalmazva. A fertőzéssel párhuzamosan fagocitákat nem, kizárólag PBMC vagy PBMC-DM tápoldatot tartalmazó kontroll mintahelyekbe élesztő szuszpenziót pipettáztunk a fertőzéshez használt mennyiségben és térfogatban. A fertőzés előtt a humán sejteken tápoldatot cseréltünk, amely tápoldatot 37 °C-ra előmelegítettünk. A fertőzéshez használt gomba sejtszámot szintén a

humán sejteknek megfelelő tápoldatban hígítottuk, majd 20 µl térfogatban adtuk a gazda sejtekhez. 3 óra inkubációt (37 °C, 100 % relatív páratartalom, 5 % CO₂ tenzió) követően a tenyésztőedényt jégre helyeztük és minden további lépést jégen végeztünk, megakadályozandó a további fagocitózist valamint az élesztők további osztódását. A tápoldattal a letapadt gazda illetve gomba sejteket felszuszpendáltuk, majd kétszer 200 µl jéghideg steril desztillált vízzel átmostuk a mintahelyeket. A szuszpenziót mikrocentrifuga csövekbe gyűjtöttük, és fecskendőre illesztett 27G vagy 29G jelű injekciós tű segítségével feltártuk a fagocitákat illetve elválasztottuk az esetleges sarjsejteket. Az élesztő sejtszám meghatározását és az ez alapján kalkulált hígítást követően a szuszpenzióból 50 µl-t szélesztettünk YPD-PS táptalajra, amelyeket két napon keresztül 30 °C-on inkubáltunk. A telepszámokat meghatároztuk, átlagoltuk és az alábbi formula felhasználásával kiszámítottuk az eliminált élesztők százalékos arányát: $[(\text{Átlag}_{\text{Kontroll}} - \text{Átlag}_{\text{Fertőzés}}) / \text{Átlag}_{\text{Kontroll}}] \times 100$. A kísérlet során három biológiai - (három mintahely) és három technikai (három csésze/1 mintahely) párhuzamost alkalmaztunk.

Gazda sejtek károsodásának meghatározása: Humán PBMC sejtekből differenciáltatott primer makrofág sejtek gomba általi károsítását a Citotoxicity Detection Kit (LDH), (Roche) segítségével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. A laktát dehidrogenáz az emlős sejtekben megtalálható, intracelluláris enzim. A koinkubáció során felszabaduló enzim mennyisége arányos a gazdasejtek károsodásának mértékével. A gazda sejteket ebben az esetben is 1:5 arányban fertőztük vad típusú, valamint deléciós törzsekkel, három technikai párhuzamost alkalmazva. Kontrollként nem fertőzött humán sejteket, valamint tiszta makrofág tápoldatot tartalmazó mintákat alkalmaztunk. A humán sejtek fertőzését 1 ml végtérfogatnyi tápoldatban végeztük, majd 24 és 48 óra inkubációt (37 °C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió) követően feülúszót gyűjtöttünk, majd a reakciót követően, a tiszta tápoldatot tartalmazó mintákat felhasználva fotometriás módszerrel meghatároztuk az egyes törzsekhez tartozó minták relatív LDH aktivitását, a gyártó utasításainak megfelelően.

Lizoszóma - fagoszóma kolokalizációs vizsgálat: A lizoszómákat LysoTracker Red (50 nM) (Invitrogen), az élesztőket calcofluor white (Sigma) (50 ng/ml) fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá. A gombákat egy éjszakán át tenyésztettük YPD-PS-ben, kétszer mostuk PBS-sel (3000 rpm, 5 perc), majd 100 µl sejtsuszpenziót 1 µl calcofluor white festékkel festettük 15 percen át szobahőn, fénytől védve. A szuszpenziót az inkubációs idő lejártát követően kétszer mostuk 1xPBS-ben, majd a sejtszámot a kívánt koncentrációra állítottuk be. A korongon

nevelt humán makrofág sejteket ötszörös mennyiségű élesztő sejtrel fertőztük. Az inkubáció időtartama ez esetben is 3 óra volt (37 °C, 100 % relatív páratartalom, 5 % CO₂ tenzió). Az inkubációt követően a mintahelyekben lévő tápoldatot, óvatos PBS-es mosást követően, 1x-es PBS-ben oldott 50 nM koncentrációjú LysoTracker Red oldatra cseréltük. Harminc perces inkubációt követően az oldatot eltávolítottuk, a mintákat kétszer mostuk 1x-es PBS-sel, majd PBS-ben, átlátszó körömlakk segítségével tárgylemezre rögzítettük. A mintákat Olympus DP-72 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Fagocitózis vizsgálat: A primer humán makrofágok fagocitáló képességének analizéséhez Alexa Fluor 647 karboxilsav, szukcinimidil észter (Life Technologies), illetve fluoreszcein-izotiocianát (FITC) (Life Technologies) fluoreszcens festékekkel jelölt élesztőket használtunk. Alexa Fluor 647 karboxilsav, szukcinimidil észter alkalmazása esetén az élesztő sejteket egy éjszakán át 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett 2 ml YPD-PS tápoldatban neveltük. Másnap a sejteket kétszer mostuk 1x PBS-ben (3000 rpm 5 perc), majd 500 µl 1x PBS-ben vettük fel őket. A szuszpenzióhoz 55 µl 1 M-os nátrium-karbonátot adtunk (pH = 10), valamint 10 µl alexa fluor 647 festéket (1 mg/ml, DMSO-ban oldva). 30 percig szobahőn, fénytől védve inkubáltuk, majd háromszor 1x PBS-ben mostuk, végül 200 µl PBS-ben vettük fel. Fluoreszcein-izotiocianát alkalmazása esetén a gombákat egy éjszakán át tenyésztettük YPD-PS-ben, kétszer mostuk PBS-sel (3000 rpm, 5 perc), majd FITC-pufferben vettük fel, amelyhez 25 µg/ml végkoncentrációban FITC festéket adtunk. A szuszpenziót fénytől elzárva 200 rpm rázatás mellett inkubáltuk egy éjszakán át 30 °C-on. A gombákat 5x mostuk 1x-es PBS-sel, majd a kívánt sejtszámra állítottuk be a szuszpenzió koncentrációját. Ezeket primer humán makrofágokkal inkubáltuk 12 mintahelyes tenyésztőedényben 120 percig 1:5 gazda:patogén arányban. Az inkubációs idő letelte után a mintahelyeket alaposan mostuk 1x-es PBS-sel, majd mintahelyenként 500 µl 37 °C-ra előmelegített TrypLE Express-t (Life Technologies) mértünk a sejtekre, melyeket 45 percig 37 °C-on inkubáltunk (5% CO₂, 100% relatív páratartalom). Az inkubációs idő letelte után a sejteket szuszpenzióba vittük, a technikai párhuzamosokat egybemostuk, majd 2000 rpm fordulaton 5 percig üleptítettük a sejteket, melyeket végül 300 µl FACS pufferben vettünk fel. Az így előkészített mintákat FACSCalibur készülékkel és a mellékelt kiértékelő szoftverrel elemeztük.

Enzim kötött immunoszorbens assay (ELISA): Az enzimkötött immunoszorbens assay méréseket az RnD DuoSet ELISA Kit (RnD) segítségével végeztük el, a gyártó utasításai szerint. A citokin (TNFα, IL-6, IL-1β) termelés vizsgálatához a primer humán makrofágokat

1:5 arányban élesztő sejtekkel fertőztünk, 500 µl végtérfogatban, két technikai párhuzamost alkalmazva. Az inkubáció időtartama 24 óra volt, amely idő letelte után felülúszókat gyűjtöttünk, melyeket felhasználásig -20 °C-on tároltunk.

5.17. *In vivo* vizsgálatok

Viaszmoly (*Galleria melonella*) lárvák fertőzése: A viaszmoly lárváinak fertőzésekor elsőként az optimális sejtszámot határoztuk meg. Ehhez az élesztő sejteket egy éjszakán át 30 °C-on 200 rpm rázatás mellett 2 ml YPD-PS tápoldatban neveltük. Másnap a sejteket kétszer mostuk 1xPBS-ben, majd a sejtszámot 10^8 sejt/ml számúra állítottuk be, majd tízszeres hígításban, öt lépcsőben hígítottuk a szuszpenziót. A sejtek injektálásához 10 µl térfogatú szuszpenziót alkalmaztunk. A fertőzéshez használni kívánt optimális sejtkoncentráció megállapítása után tizes csoportokban fertőztük a lárvákat, a következők szerint: 1x PBS-el injektált csoport, vad típusú törzsszel fertőzött csoport, valamint a deléciós törzsszel fertőzött csoport. A fertőzést követően 30 °C-on tartottuk a lárvákat, naponta vizsgáltuk a túlélési rátát, két héten keresztül.

5.18. Sejtfalösszetétel vizsgálatok

Sejtfali kitin, kitin oligomer, β -1,3 glükán és mannán tartalom meghatározása: A sejtfalban megtalálható szénhidrát polimerek és oligomerek meghatározásához a 30°C-on YPD tápközegben felnevesztett élesztő sejteket 1x PBS-ben mostuk, majd 2% paraformaldehidet tartalmazó 1x PBS-ben egy órán keresztül szobahőn fixáltuk. Az inkubációs idő után a sejteket 1% BSA-t tartalmazó 1x PBS-ben inkubáltuk további egy órán keresztül, majd 1x PBS-ben mostuk.

A sejtfal β -glükán tartalmának meghatározásához 10^5 számú fixált sejtet 0,1 mg/ml koncentrációjú anilinkék (Arcolor, Sao Paulo, SP, Brazil) festékkel 5 percig szobahőn festettük, majd a sejteket 1x PBS-el mostuk. A teljes fluoreszencia meghatározását Spectra Max Gemini XPS spektrofluoriméterrel (Molecular Devices) végeztük. Gerjesztési hullámhosszként 400nm-t alkalmaztunk, míg az emissziós hullámhosszt 460nm-en detektáltuk. Kontrollként festetlen mintát alkalmaztunk.

A sejtfali kitin tartalom meghatározásához 25 µM koncentrációjú Calcofluor white (Invitrogen, Life technologies), a sejtfali kitin oligomerek mennyiségének meghatározásához 50 µg/ml koncentrációjú Alexa fluor 594-konjugált WGA (Molecular Probes), míg a sejtfal

α -mannán tartalmának meghatározásához 100 μ g/ml koncentrációjú fluorescein-izothiocianát (FITC) konjugált ConA (Sigma-Aldrich) fluoreszcens festékeket alkalmaztunk. A fixált sejtek 10⁶ mennyiségét 1ml, a megfelelő fluoreszcens festéket tartalmazó 1x PBS-ben 30 percig szobahőn inkubáltuk, majd 1x PBS-ben háromszor mostuk (3000rpm, 5 perc). A festett sejteket Zeiss Observer Z.1 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, a képeket ZENN 2011 (Zeiss) szoftverrel rögzítettük. A képek elemzését az analySIS (Soft Image System) és az ImageJ programokkal végeztük.

Extracelluláris vezikula izoláció: Az YPD tápközegeben felnevesztett tenyészetek felülúszóit két lépésben sejtmentesre centrifugáltuk (1. lépés: 4000g, 15 perc, 4°C, 2. lépés: 15.000g, 15 perc, 4°C). A sejtmentes felülúszót 100 kDa-os Amicon ultraszűrőn koncentráltuk, majd a koncentrált felülúszót ismét két lépésben centrifugáltuk (1. lépés: 4000g, 15 perc, 4°C, 2. lépés: 15.000g, 15 perc, 4°C). Az így kapott, tisztított felülúszót ultracentrifugálásnak vetettük alá (100.000g, 60 perc, 4°C). Az így kapott pelletet 0,1 M Tris-t tartalmazó 1x PBS-el mostuk. Az extravezikuláris glükoxilomannán szennyeződés kiküszöbölése érdekében a mintát cianogén-bromid aktivált, monoklonális glükoxilomannán kötött Sepharose oszlopon tisztítottuk. Az átfolyó frakciót 100.000 g-vel 60 percig centrifugáltuk. Az extracelluláris vezikula frakció koncentrációjának meghatározását az Amplex Red Sterol Assay Kit (Molecular Probes, Life Technologies, Grand 6 Island, NY, USA) segítségével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően.

Az extracelluláris vezikulák méretének meghatározása: Az extracelluláris vezikulák átmérőjének meghatározását 90Plus/BI-MAS Multi Angle Particle Sizing analyzer (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY, USA) berendezéssel határoztuk meg. A mérés 25°C-on történt. Az extracelluláris vezikulák méret szerinti megoszlásának analíziséhez a non-negatively constrained least squares algoritmust használtuk.

Scanning elektronmikroszkópia: A *C. parapsilosis* vad típusú és deléciós mutáns törzseinek scanning elektronmikroszkópos vizsgálatához 10⁷ sejtet használtunk fel, melyeket poli L-lizinnel bevont fedőlemezen rögzítettünk. A sejteket 1x PBS-ben mostuk, majd a mintákat 2,5 % glutáraldehidet tartalmazó Sorenson-pufferben (pH=7,5) egy éjszakán át 4 °C-on fixáltuk. A szárítást felszálló alkoholsorral végeztük: 50% etanol (2x15 perc, jégen), 70% etanol (2x15 perc jégen), 80% etanol (2x15 perc, jégen), 90% etanol (2x15 perc, jégen), 95% etanol (2x15 perc, jégen), abszolút etanol (2x15 perc, jégen). A fedőlemezeket ezután terc-

butil alkohol : abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd 100%-os terc-butil alkoholba helyeztük 1-1 órára szobahőmérsékleten. A mintákat végül tömény terc-butil alkoholban 4 °C-on megfagyasztottuk, és egy éjszakán át liofilizáltuk. Másnap a megfelelő alumínium hengerekre rögzítettük a korongokat, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') a mintákat JEOL JSM-5310 scanning elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

5.19. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését és a különbségek szignifikanciájának kiszámítását ANOVA és páratlan T-teszt analízissel, a GrapPad Prism 6 szoftverrel végeztük. A különbségeket $P < 0,05$ értékek esetén tekintettük szignifikánsnak.

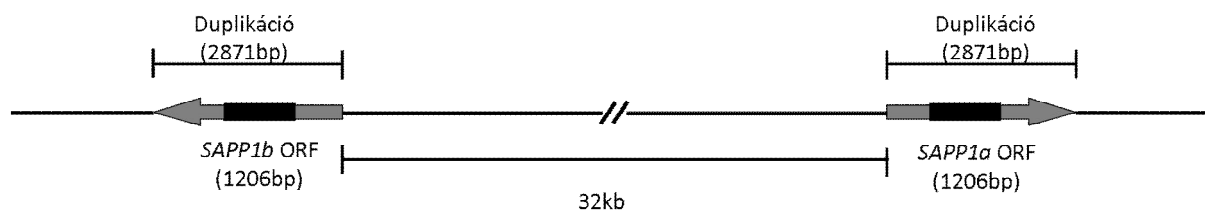
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1. A *C. parapsilosis* Sapp1 fehérjének, valamint a szekretált aszpartil proteinázok általános szerepének virulenciában betöltött vizsgálata

Bár munkánk kezdetén a *C. parapsilosis* Sapp1 fehérjének virulenciában betöltött szerepét vizsgáltuk, mégis a munka jobb megértésének érdekében jobbnak láttuk a *C. parapsilosis* Sapp1 fehérjének és a szekretált aszpartil proteinázok általános szerepének vizsgálatát egy fejezetben tárgyalni.

6.1.1. A *C. parapsilosis* *SAPP1* lokuszának *in silico* analízise

Munkánk kezdetén a *C. parapsilosis* fő szekretált aszpartil proteináza, a Sapp1 virulenciában betöltött szerepét vizsgáltuk. Az ekkoriban a Sanger intézet *C. parapsilosis* „genome database” (www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis) honlapján rendelkezésünkre álló szekvencia adatok alapján elvégeztük a *SAPP1* ORF *in silico* analízisét. Az analízis eredményeként sikeresen azonosítottunk két, identikus 2871bp méretű szekvenciárészt, egymástól 32kb távolságra amely egy-egy kópiában tartalmazta a *SAPP1* ORF-et (1206bp). A duplikálódott szakaszban található *SAPP1* géneket *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettük el egymástól (8. ábra).



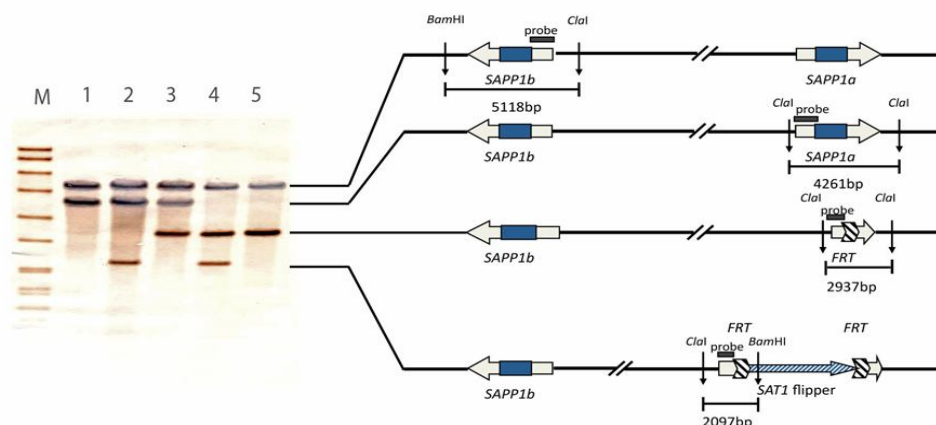
8. ábra

2871 bp méreű duplikálódott régió, egymástól 32kb távolságban, melyek a *SAPP1* ORF-et tartalmazzák. A két kópiában jelen lévő *SAPP1* gént *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettük el egymástól.

6.1.2. A Δ/Δ sapp1a, Δ/Δ sapp1b és a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b homozigóta deléciós mutánsok létrehozása

Ahhoz, hogy a Sapp1 fehérje virulenciában betöltött szerepét vizsgáljuk, a *C. parapsilosis* GA1 jelű klinikai izolátumát, mint vad típusú törzset felhasználva a *SAPP1* gének négy alléljának delécióját hajtottuk végre. Ezen munka során a *C. albicans*-ban kifejlesztett, majd *C. parapsilosis*-ra optimalizált *caSAT1* flipper rendszer segítségével előállítottunk homozigóta Δ/Δ sapp1a, Δ/Δ sapp1b egyszeres és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b dupla deléciós mutáns törzseket.

A Δ/Δ sapp1a homozigóta deléciós mutáns törzs esetén a pSFS2Sapp1a konstrukció segítségével a *SAPP1a* gén delécióját hajtottuk végre. A deléciós mutáns létrehozása során Southern hibridizációval követtük a gén deléciójának folyamatát, a *SAPP1a* gén upstream homológ régióját, mint hibridizációs próbát felhasználva. A Southern hibridizációhoz alkalmazott *Cla*I-*Bam*HI kettős emésztés lehetővé tette a *SAPP1a* és *SAPP1b* lokuszok egyértelmű elkülönítését (9. ábra).

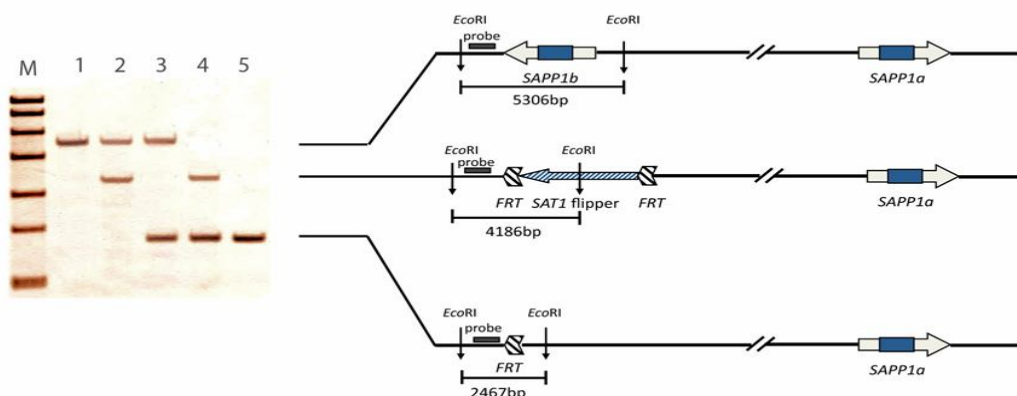


9.ábra

A Δ/Δ sapp1a homozigóta deléciós mutáns létrehozása.

M: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche), 1.: *C. parapsilosis* WT GA1, 2.: *sapp1a* Δ ::FRT-SAT1-FRT/*SAPP1a*/*SAPP1b*/*SAPP1b*. 3.: *sapp1a* Δ ::FRT/*SAPP1a*/*SAPP1b*/*SAPP1b*, 4.: *sapp1a* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT-SAT1-FRT/*SAPP1b*/*SAPP1b*, 5.: *sapp1a* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT/*SAPP1b*/*SAPP1b*.

Ahhoz, hogy a *SAPP1b* lokusz delécióját végrehajtsuk, a pSFS2SAPP1a vektor alkalmazása sikertelennek bizonyult. Ezen probléma áthidalására a *SAPP1b* lokusz sikeres deléciójának végrehajtása céljából egy ezen lokuszra specifikus pSFS2Sapp1b konstrukciót hoztunk létre, a duplikálódott régió kívül eső szekvenciák felhasználásával. Ezen konstrukció felhasználásával a vad típusú izolátum felhasználásával sikeresen létrehoztuk az organizmus homozigóta deléciós Δ/Δ sapp1b mutáns törzsét (10. ábra).

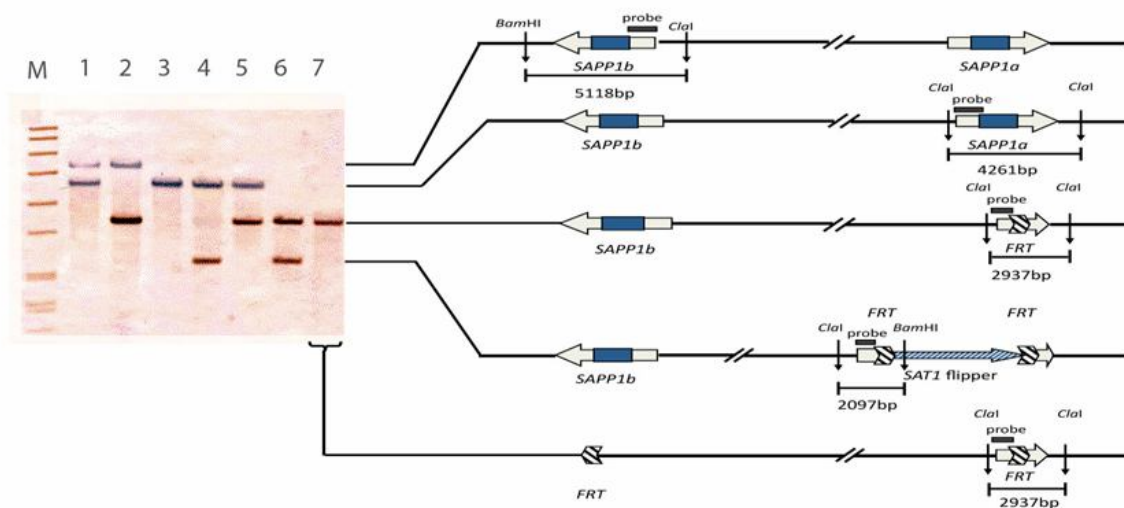


10. ábra

A $\Delta/sapp1b$ homozigóta deléziós mutáns létrehozása.

M: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche), 1.: *C. parapsilosis* WT GA1, 2.: *sapp1b* Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1b/SAPP1a/SAPP1a, 3.: *sapp1b* Δ ::FRT/SAPP1b/SAPP1a/SAPP1a, 4.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1a/SAPP1a, 5.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT/SAPP1a/SAPP1a.

Az így módon előállított homozigóta deléziós $\Delta/sapp1b$ mutáns törzs segítségével állítottuk elő a $\Delta/sapp1a$ - $\Delta/sapp1b$ dupla deléziós mutáns törzset. Ennek elérése érdekében a $\Delta/sapp1b$ deléziós törzset újra a pSFS2Sapp1a konstrukcióval transzformáltuk (11. ábra).



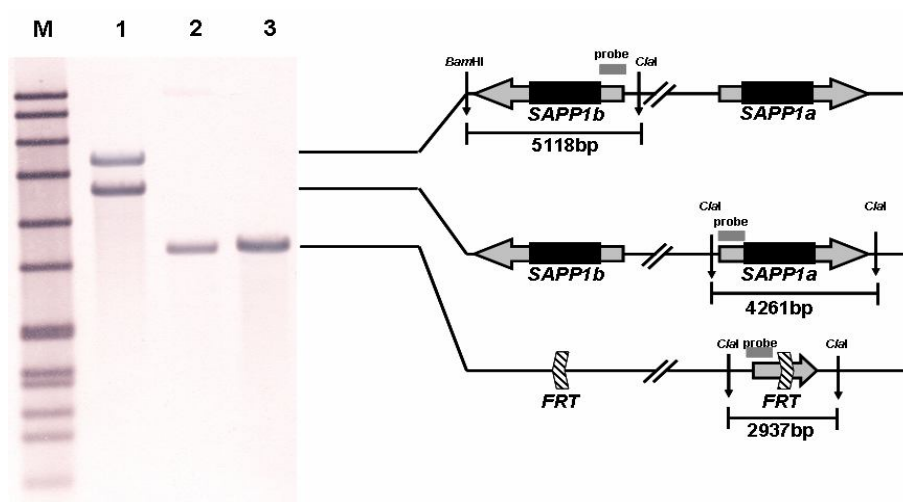
11. ábra

A homozigóta deléziós $\Delta/sapp1a$ - $\Delta/sapp1b$ dupla deléziós mutáns törzs létrehozása.

M: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche), 1.: *C. parapsilosis* WT GA1, 2.: *sapp1a* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT/SAPP1b/SAPP1b, 3.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT/SAPP1a/SAPP1a, 4.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT-SAT1-FRT/SAPP1a, 5.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT/SAPP1a, 6.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT-SAT1-FRT, 7.: *sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1b* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT/*sapp1a* Δ ::FRT

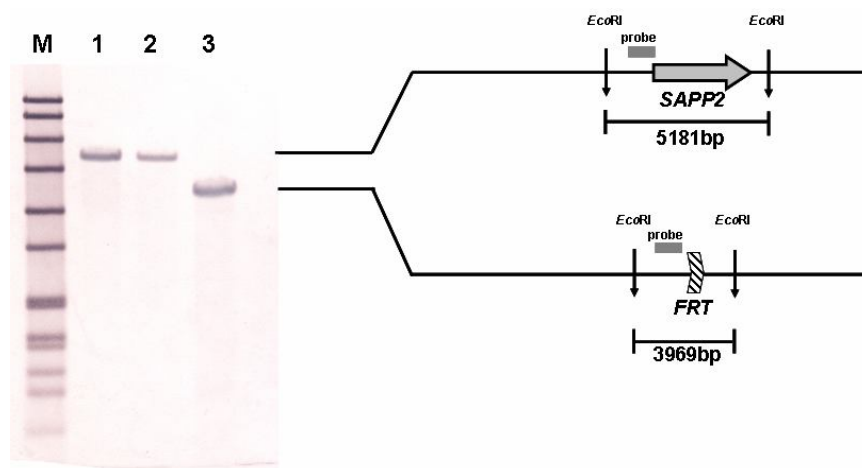
6.1.3. A *C. parapsilosis* Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 deléciós törzs előállítása

A *C. parapsilosis* Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b deléciós törzs előállítása után, munkánk következő szakaszában célunk volt a *C. parapsilosis* által szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepének általános jellemzése, így egy Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 deléciós törzs létrehozása. Ez a célkitűzés különösen indokolt annak fényében, hogy *C. albicans* esetében a Sap enzimek általános, virulenciában betöltött szerepének vizsgálata szinte lehetetlen, a nagyszámú szekretált proteinázt kódoló gén jelenléte miatt. Egy szekretált proteinázt nem termelő *C. albicans* törzs előállításához, legkevesebb 20 allél delécióját kellene megvalósítani, amely a jelenleg rendelkezésre álló genetikai manipulációs technikákkal kivitelezhetetlen feladat. *C. parapsilosis*-ban ezzel szemben csupán 2 szekretált proteinázt kódoló gén ismert, melyekről bizonyítottan funkcióképes fehérjék íródnak át és szekretálódnak (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009) így ezen gének deléciójával egy olyan modell organizmus volt létrehozható, amely szélesebb értelemben a szekretált proteinázok virulenciában és patogenitásban betöltött szerepének megértéséhez is hozzájárulhat. Ennek elérése érdekében a *SAPP2* gén delécióját hajtottuk végre a *C. parapsilosis* Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b deléciós törzs háttérén. Érdekes módon már az első transzformálási kör után homozigóta Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzset sikerült létrehoznunk. A *SAPP2* gén delécióját a vad típusú és a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b valamint a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 deléciós törzsek felhasználásával, a *SAPP1* upstream és a *SAPP2* downstream jelölt hibridizációs próbák segítségével ellenőriztük (12. és 13. ábra).



12. ábra

A Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 tripla deléciós törzs Southern analízise, *SAPP1* upstream hibridizációs próba felhasználásával, *ClaI*-*Bam*HI kettős emésztést alkalmazva. M: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche), 1.: *C. parapsilosis* WT GA1, 2.: *sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*, 3.: *sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*/*sapp2* Δ ::*FRT*/*sapp2* Δ ::*FRT*



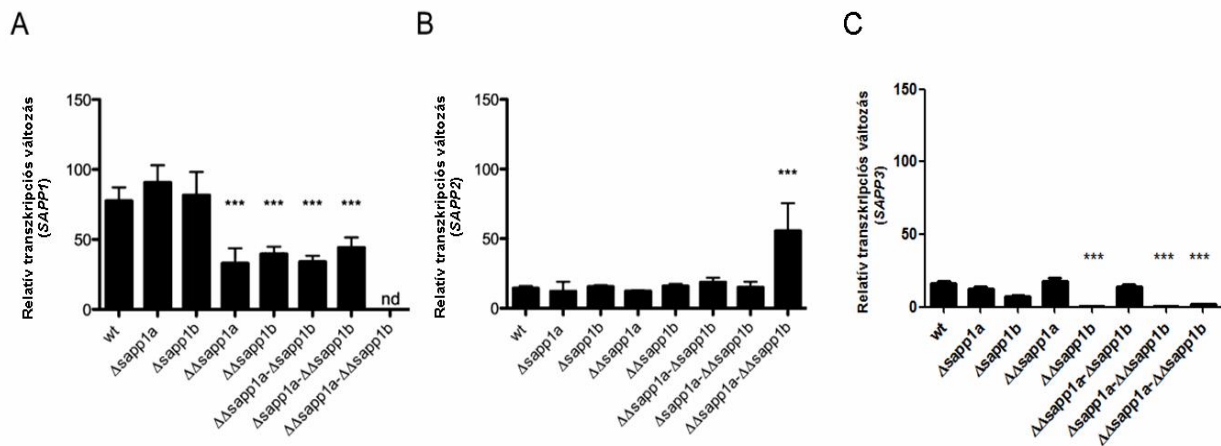
13. ábra

A Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 tripla deléciós törzs Southern analízise, *SAPP2* downstream hibridizációs próba felhasználásával, *EcoRI* emésztést alkalmazva. M: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche), 1.: *C. parapsilosis* WT GA1, 2.: *sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*, 3.: *sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1b* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*/*sapp1a* Δ ::*FRT*/*sapp2* Δ ::*FRT*/*sapp2* Δ ::*FRT*

6.1.4. A szekretált aszpartil proteináz gének kvantitatív *in vitro* transzkripciójának vizsgálata

Annak érdekében, hogy az előállított deléciós mutáns törzsek szekretált aszpartil proteináz génjeinek relatív transzkripció szintjében bekövetkezett változásokat vizsgáljuk, kvantitatív real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálatot végeztünk a vad típusú és deléciós mutáns törzsek bevonásával. Munkánk során vizsgáltuk a *SAPP1* és *SAPP2* gének transzkripciójában bekövetkezett változásokat, amely gének bizonyítottan funkcióképes fehérjét kódolnak (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009). Vizsgáltuk továbbá a *SAPP3* gén transzkripciójának változását is, amely gén termékét nem sikerült azonosítani, ám kollaborátorunk, Dr. Olga Hruskova-Heidingsfeldova jelezte, hogy jövőbeli tervei közt szerepel ezen gén által kódolt fehérje azonosítása és jellemzése is(14. és 15. ábra). A transzkripció változások követéséhez a vad típusú és mutáns törzseket proteináz termelést indukáló (1x YCB + 2 % BSA) és nem indukáló (YPD) médiumban egy éjszakán át, 30 °C-on tenyésztettük. A vad típusú törzs esetén nem induktív körülmények között (YPD) mind a *SAPP1* mind a *SAPP2* és *SAPP3* gének alacsony szintű transzkripciója megfigyelhető volt. A proteináz termelést indukáló médiumban tenyésztett vad típusú minta esetén a *SAPP1* gén transzkriptum mennyisége nyolcvanszorosára nőtt az YPD médiumban nevelthez képest. A *SAPP2* és *SAPP3* gének esetén mintegy tizenötszörös indukció volt megfigyelhető. A Δ/Δ sapp1a és Δ/Δ sapp1b homozigóta deléciós mutáns törzsek esetén a *SAPP1* gén transzkripcióját vizsgálva a vad típusú törzshöz képest 50 %-os csökkenés volt megfigyelhető az említett gén expressziójában, míg a *SAPP2* gén expressziós szintjében nem volt változás.

A $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ dupla deléciós mutáns törzs esetén nem volt detektálható *SAPP1* génexpresszió, viszont a *SAPP2* gén expressziója szignifikánsan megemelkedett a vad típusú törzshöz képest, ami feltételezhetően egy visszacsatoló mechanizmus általi kompenzáció a proteináz termelésben, melyet a *SAPP1* gének elvesztése váltott ki. A *SAPP3* gén transzkripció változását vizsgálva a $\Delta/\Delta sapp1b$, $\Delta/\Delta sapp1b-\Delta sapp1a$ és a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ törzsek esetén a transzkripció szintje csaknem nullára esett vissza. Ezen jelenség magyarázatául szolgálhat, hogy a *SAPP1b* lokusz deléciója a duplikálódott régiójának deléciójával volt kivitelezhető. A későbbi szekvencia analízis kiderítette, hogy a *SAPP3* lokusz ezen szakasztól csupán mintegy 500 bázispár távolságban helyezkedik el, így a *SAPP1b* deléciója valószínűsíthetően a *SAPP3* lokusz szabályozó régióját is érintette.

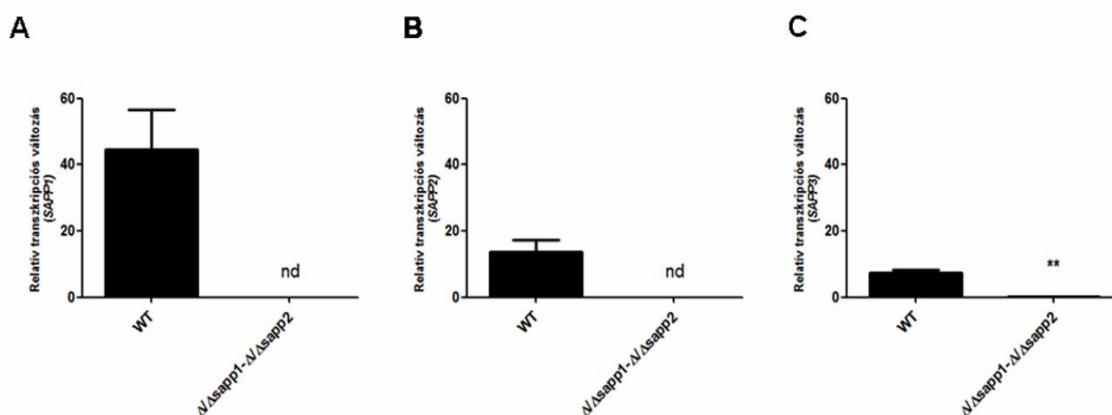


14. ábra

A *SAPP1* (A), *SAPP2* (B) és *SAPP3* (C) gének transzkripció változása *in vitro* kvantitatív real-time PCR analízise *SAPP1* deléciós mutáns törzsek esetén. A *SAPP1* gén expressziója a $\Delta/\Delta sapp1a$, $\Delta/\Delta sapp1b$, $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta sapp1b$ és a $\Delta/\Delta sapp1b-\Delta sapp1a$ deléciós mutánsok esetén szignifikáns csökkenést mutatott (***: $P < 0,0001$), míg a dupla deléciós mutáns esetén *SAPP1* génexpresszió nem volt megfigyelhető. A *SAPP2* gén transzkripció változását vizsgálva a dupla deléciós mutáns esetén a gén transzkripció szintje szignifikánsan megemelkedett (***: $P < 0,0001$). A *SAPP3* transzkripciója a $\Delta/\Delta sapp1b$, a $\Delta/\Delta sapp1b-\Delta sapp1a$ és a dupla deléciós mutáns törzsek esetén szignifikáns csökkenést mutatott (***: $P < 0,0001$).

Hasonlóan a *SAPP1* deléciós törzsekhez, vizsgáltuk az előállított $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ törzs esetén is a *SAPP* gének transzkripciójának változását. A vad típusú törzs esetén a proteináz termelést indukáló médiumból származó mintában mintegy ötvenszeres *SAPP1* transzkripció növekedést figyeltünk meg, míg a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ deléciós törzs esetén detektálható *SAPP1* génexpresszió nem volt megfigyelhető. A *SAPP2* gén transzkripció változása esetén a vad típusú törzsben mintegy tizenötszörös növekedést figyeltünk meg, míg a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ deléciós törzs esetén detektálható *SAPP2* génexpresszió nem volt megfigyelhető. A *SAPP3* gén expressziója esetén a vad típusú

törzsben mintegy nyolcszoros relatív transzkripció szintet figyeltünk meg, míg a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ - $\Delta/\Delta sapp2$ deléciós törzs esetén a *SAPP3* gén expressziója csupán mintegy 10%-a volt az YPD tápközegben nevelt vad típusú kontrollhoz képest (15. ábra).

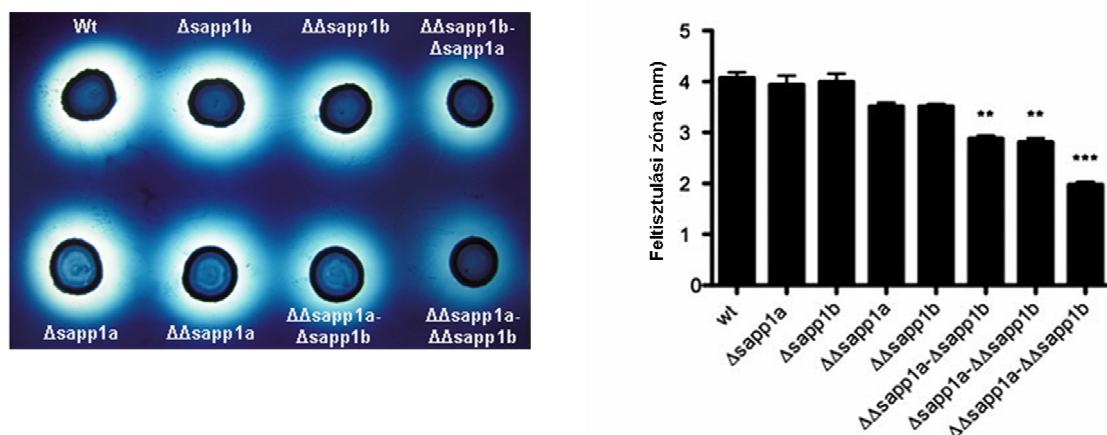


15. ábra

A *SAPP1* (A), *SAPP2* (B) és *SAPP3* (C) gének expressziójának *in vitro* kvantitatív real-time PCR analízise. A vad típusú törzshöz képest a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ - $\Delta/\Delta sapp2$ törzs esetén sem *SAPP1*, sem *SAPP2* génexpresszió nem volt megfigyelhető, míg a *SAPP3* gén expressziója a vad típusúhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott (**: $P < 0,001$).

6.1.5. Az extracelluláris proteináz aktivitás vizsgálata

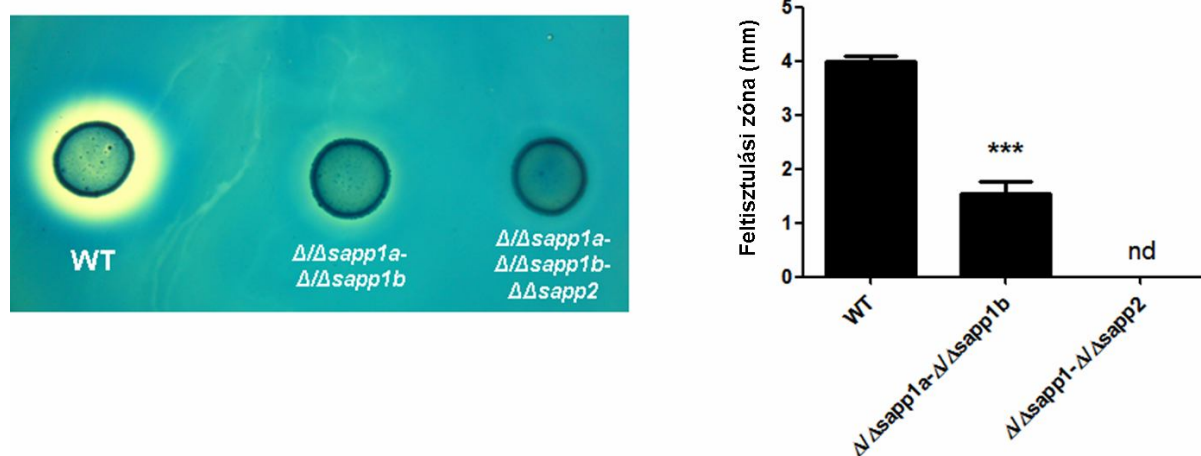
Egy előzetes tanulmány szerint a *C. parapsilosis* fő szekretált azpartil proteináza a Sapp1 fehérje (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009). Annak érdekében, hogy a proteináz aktivitás változását vizsgáljuk, a vad típusú és mutáns törzsek (*Δsapp1a*, *Δsapp1b*, $\Delta/\Delta sapp1a$, $\Delta/\Delta sapp1b$, $\Delta/\Delta sapp1a$ -*Δsapp1b*, *Δsapp1b*- $\Delta/\Delta sapp1a$, $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$) 5-5 μl-ét proteináz aktivitás detektálására alkalmas (1x YCB + 2 % BSA) csészére csepegtettünk, 10^8 /ml sejtszámban. A csészéket 30 °C-on 2 napig inkubáltuk, majd amidoblack festékkel festettük, végül mostuk. A mosást követően a feltisztulási zóna nagyságából következtettünk a proteináz aktivitás mértékére (16. ábra). Ez esetben a vad típusú, valamint a heterozigóta *Δsapp1a* és *Δsapp1b* törzsek proteináz aktivitása azonosnak bizonyult, míg a $\Delta/\Delta sapp1a$ -*Δsapp1b*, illetve a *Δsapp1b*- $\Delta/\Delta sapp1a$ és a Sapp1 fehérjét nem termelő $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ törzs proteináz aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott a vad típusúhoz képest.



16. ábra

A vad típusú és *SAPP1* deléciós mutáns törzsek extracelluláris proteináz aktivitásainak detektálása. A $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta sapp1b$, $\Delta/\Delta sapp1b-\Delta sapp1a$ és a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ törzs proteináz aktivitása szignifikánsan csökkent a vad típushoz képest (**: $P < 0,005$, ***: $P < 0,0001$).

Hasonlóan az előzőekhez, a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ törzs bevonásával szintén elvégeztük az extracelluláris proteináz termelés vizsgálatát. Ezen törzs mellett a vad típusú, valamint a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ törzseket vontuk be a vizsgálatba (17. ábra).



17. ábra

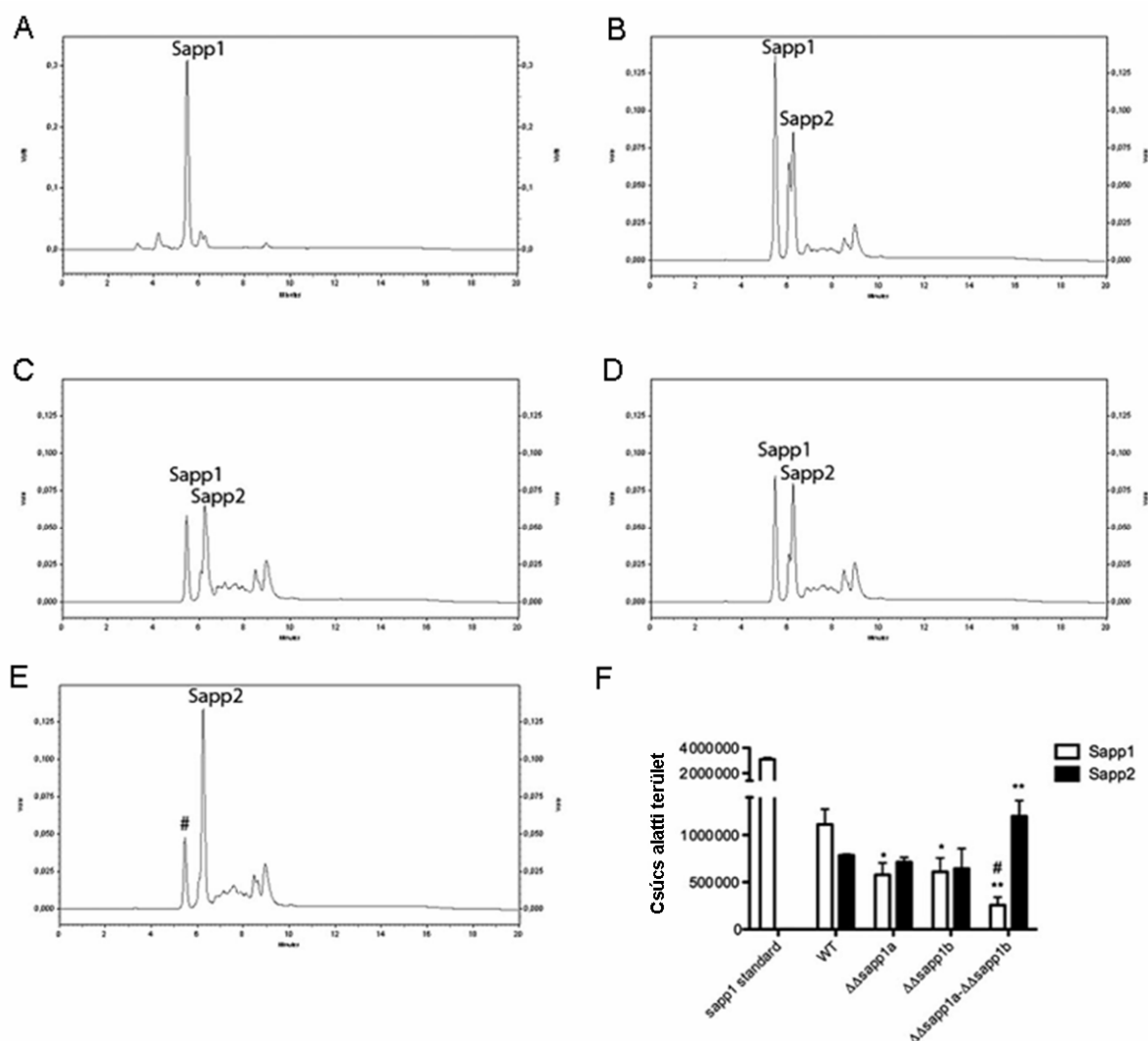
A vad típusú, valamint a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ és $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ törzsek extracelluláris proteináz termelésének detektálása. A vad típusú törzshöz képest a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ törzs proteáz termelése szignifikánsan csökkent (***: $P = 0,0007$), míg a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ törzs esetén detektálható extracelluláris proteináz aktivitás nem volt kimutatható.

A $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b-\Delta/\Delta sapp2$ törzs esetén ezzel a módszerrel extracelluláris proteináz termelés nem volt detektálható.

6.1.6. A Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitások kvantitatív vizsgálata

Annak érdekében, hogy a termelődött Sapp1 és Sapp2 enzimek aktivitásáról felvilágosítást kapjunk, a vad típusú, valamint a $\Delta/\Delta sappa1a$, $\Delta/\Delta sappa1b$ és a $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ törzseket 1x YCB + 2 % BSA médiumban 30 °C-on egy éjszakán át növesztettük, majd a felülúszót 10 kDa-os ultraszűrőn koncentráltuk. A DABCYL-Glu-His-Val-Lys-Leu-Val-Glu-EDANS specifikus fluoreszcens szubsztrát segítségével a Sapp1 és Sapp2 fehérjék aktivitásának mérése fluoreszcens detektorral felszerelt HPLC készüléken lehetséges. A szubsztráton belül a Sapp1 fehérje a Leu-Val, míg a Sapp2 fehérje a Lys-Leu kötéseket hasítja, a kapott hasítási termék a két fehérjére specifikus. A méréshez kontrollként tisztított Sapp1 enzimet használtunk fel. Mind a fluoreszcens szubsztrátot, mind a tisztított Sapp1 fehérjét Dr. Olga Hruskova-Heidingsfeldova bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálatok során a vad típusú, valamint a $\Delta/\Delta sappa1a$ és $\Delta/\Delta sappa1b$ törzsek esetén két csúcsot lehetett megfigyelni, amelyek a Sapp1 és Sapp2 enzimek működése során létrejött hasítási termékekre karakterisztikusak. A $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ dupla deléciós mutáns törzs esetén csak a Sapp2 enzimre specifikus csúcsot lehetett megfigyelni, valamint egy nem specifikus csúcsot, amelynek retenciós ideje nagyon közeli a Sapp1 működése során létrehozott termékre jellemző csúcsával (18. ábra). Ezen megfigyelt, nem specifikus csúcs korábbi tanulmányokban azonosításra került (Dostal és mtsai. 2005, Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009). Retenciós ideje nagyon közeli a Sapp1 fehérjére jellemző csúcsával, ám nem maradék Sapp1 fehérje aktivitásra utal. Dr. Olga Hruskova-Heidingsfeldova-val folytatott további konzultációk során egy előzetes vizsgálat szerint a Sapp2 fehérjének két különböző izoformája létezhet, amely a specifitásra is kihat, így az eddig nem specifikusnak gondolt csúcs valószínűsíthetően ezen másik Sapp2 izoforma működése által jöhetett létre (Olga Hruskova-Heidingsfeldova, nem közölt adat, személyes konzultáció). Bár Dr. Olga Hruskova-Heidingsfeldova rendelkezésre bocsátotta az általuk tisztított Sapp2 fehérjét is, melyet kontrollként kívántunk felhasználni, ám annak hasítási képe megegyezett a Sapp1 fehérje hasítási képével, így a Sapp2 további felhasználásától eltekintettünk, mivel új információt nem adott, ám ez az eredmény tovább erősíti annak lehetőségét, hogy a Sapp2 fehérjének két izoformája létezhet, eltérő specifitással. Ennek tanulmányozása jelenleg is folyik Dr. Olga Hruskova-Heidingsfeldova laboratóriumában. A vad típusú törzzsel összevetve a $\Delta/\Delta sappa1a$ törzs esetén a Sapp1 fehérje aktivitása mintegy 45%-al esett vissza, míg a $\Delta/\Delta sappa1b$ törzs esetén a Sapp1 fehérje aktivitásának csökkenése 30%-os volt. A dupla deléciós mutáns törzs esetén nem volt detektálható Sapp1 általi hasításra jellemző csúcs, amely enzim aktivitási szinten is igazolja a deléció meglétét.

Ugyanezen törzs esetén a Sapp2 fehérje aktivitásában 50%-os növekedés volt megfigyelhető, amely megerősíti a qRT-PCR vizsgálat által felfedezett kompenzációs mechanizmus meglétét.

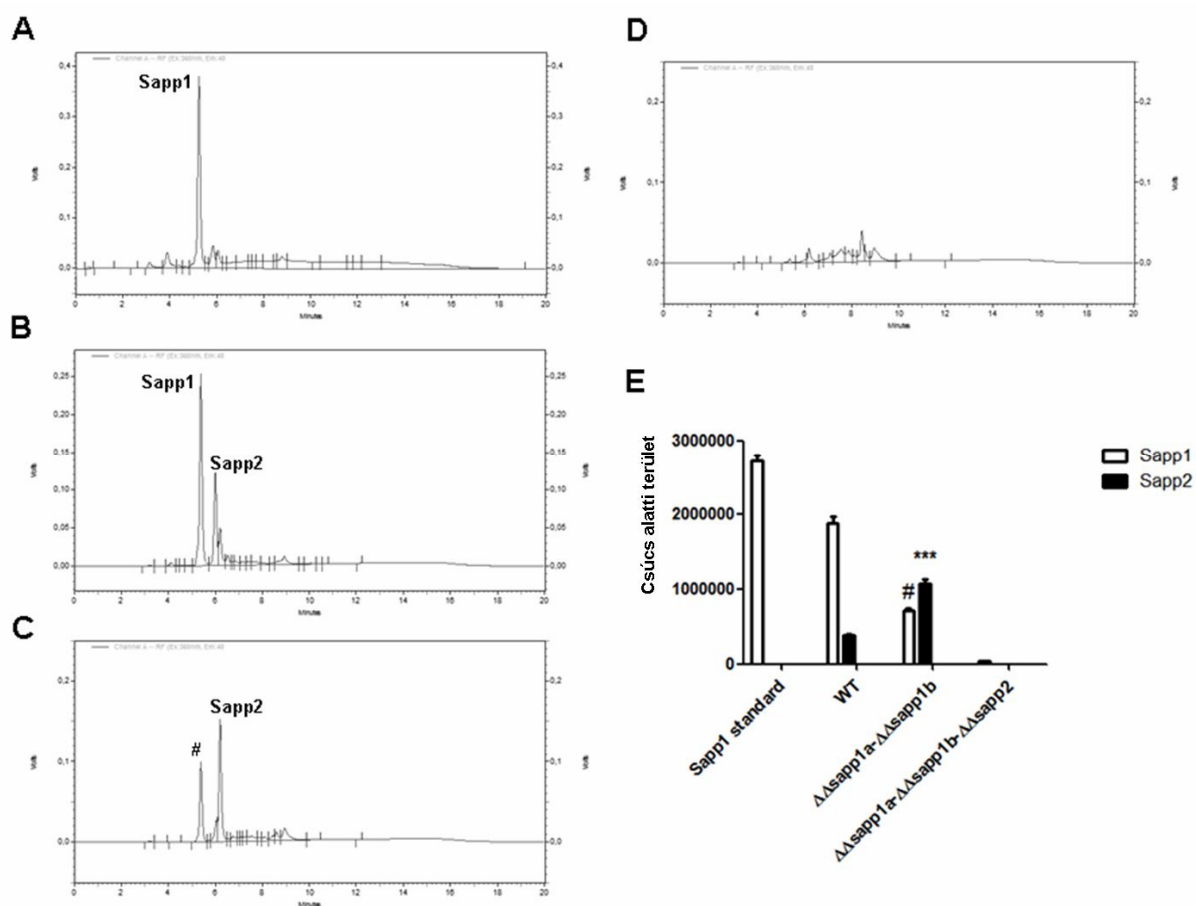


18. ábra

A Sapp1 és Sapp2 fehérjék aktivitásának kvantitatív HPLC analízise. **A:** a tisztított Sapp1 fehérje aktivitásának kimutatása. **B:** *C. parapsilosis* vad típusú törzs felülúszójának Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitása. **C:** a Δ/Δ sapp1a, **D:** a Δ/Δ sapp1b, **E:** a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b törzs felülúszójának Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitása. **F:** Az egyes törzsek enzimaktivitásainak összefoglaló diagramja. #: nem Sapp1 specifikus csúcs (valószínűsíthetően a Sapp2 egyik izoformájának működése következtében lérejevő jel). (**: $P < 0,005$, *: $P < 0,05$).

A vad típusú, valamint a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek bevonásával szintén elvégeztük a Sapp1 és Sapp2 fehérjék enzimaktivitásának kvantitatív analízisét. Kontrollként ebben az esetben is tisztított Sapp1 enzimet használtunk (19. ábra). A Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b törzs esetén ebben az esetben is csak a Sapp2 enzimaktivításra specifikus csúcsot lehetett megfigyelni. Ezen mutáns esetén újra megfigyelhető volt a Sapp2 fehérje termelődésének illetve aktivitásának szignifikáns mértékű emelkedése. A Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzs esetén a Sapp1 fehérjére karakterisztikus csúcsot nem tudtunk

megfigyelni. A Sapp2 fehérjére karakterisztikus csúcs szintén eltűnt ezen mutáns esetében. Olga Hruskova-Heidingsfeldova és kollégái által azonosított (Dostal és mtsai. 2005, Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009), valamint a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzs esetében általunk is megfigyelt nem karakterisztikus csúcs a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzs esetén szintén eltűnt. Ez az eredmény megerősíti azt, hogy ezen csúcs valójában a Sapp2 fehérje másik izoformájának terméke lehet, amely izoforma eltérő szubsztrát specifitással rendelkezik.



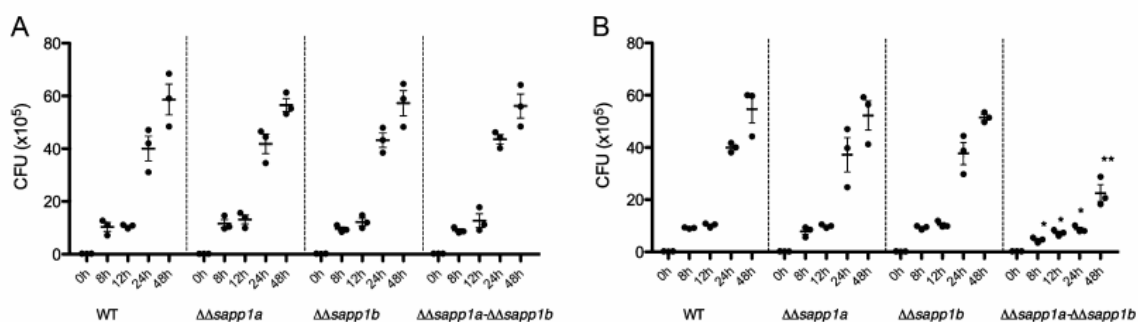
19. ábra

A Sapp1 és Sapp2 fehérjék aktivitásának kvantitatív HPLC analízise. **A:** a tisztított Sapp1 fehérje aktivitásának kimutatása. **B:** *C. parapsilosis* vad típusú törzs felülúszójának Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitása. **C:** a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzs Sapp1 és Sapp2 enzimaktivitásának kromatogramja. **D:** $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ tripla deléciós törzs HPLC analízise. A $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzs esetén a Sapp2 fehérje termelődésében szignifikáns növekedés figyelhető meg (**E**) (***; $P=0,0002$), míg a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ tripla deléciós törzs esetén sem a Sapp1, sem a Sapp2 fehérje aktivitása nem figyelhető meg. #: valószínűsíthetően a Sapp2 fehérje izoformája által létrehozott csúcs.

6.1.7. A vad típusú és a deléciós törzsek szérumerzékenységének vizsgálata

C. albicans esetén kimutatták, hogy a szekretált aszpartil proteinázok képesek számos, a humán szérumban megtalálható antimikrobiális fehérje bontására, ezáltal elősegítve a

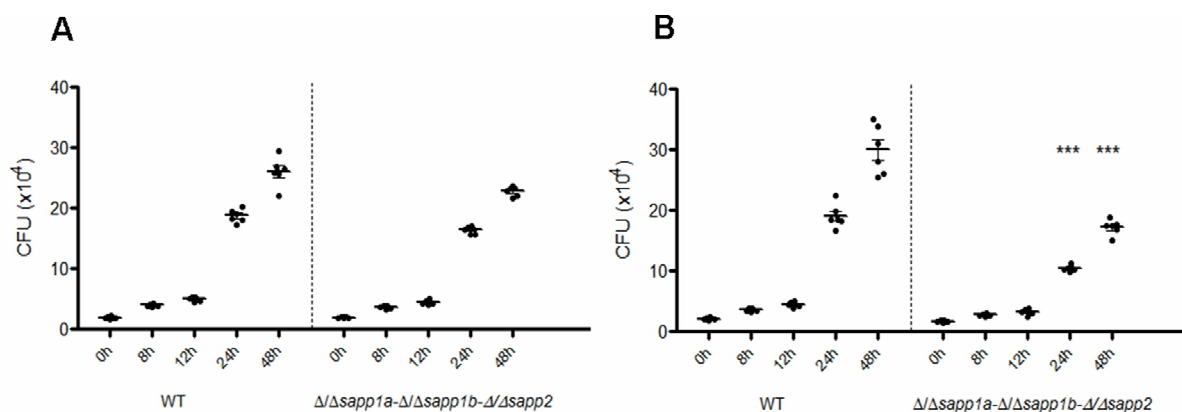
mikroba terjedését. Ezen mikroorganizmus fő szekretált proteináza, a CaSap2 képes az immunglobulinok, a katepszin D, valamint komplement komponensek bontására (Hube 1998), (Gropp és mtsai. 2009). Ezen adatokból kiindulva munkánk során vizsgáltuk a vad típusú, valamint a deléciós mutáns törzsek szérumban történő növekedését, amely által információt nyerhettünk arra vonatkozóan, hogy a *C. parapsilosis* Sapp fehérjei rendelkeznek-e hasonló tulajdonságokkal. A szérumerzékenység vizsgálathoz a vad típusú és mutáns törzseket 3×10^4 /ml koncentrációban, 20% intakt, illetve 20% hővel inaktivált szérumot tartalmazó PBS oldatban 30 °C-on 200 rpm-en rázattuk. 0, 8, 12, 24 és 48 óra elteltével YPD csészére szélesztettük a minták 50-50 μ l-ét, a megfelelő hígítást alkalmazva, törzsenként három párhuzamos alkalmazásával, majd CFU meghatározást végeztünk. Míg a hővel inaktivált, 20% humán szérumot tartalmazó kultúrák esetén minden törzs hasonló mértékű növekedésre volt képes, addig a 20% intakt humán szérumot tartalmazó médium esetén a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b dupla deléciós mutáns törzs növekedése mind 24 óra, mind 48 óra inkubáció után szignifikáns csökkenést mutatott a vad típusú törzshöz képest. A Δ/Δ sapp1a és Δ/Δ sapp1b törzsek és a vad típusú törzs növekedési rátája közt nem mutatkozott eltérés (20. ábra). A dupla deléciós mutáns törzs csökkent növekedési rátája arra enged következtetni, hogy a Sapp1 fehérjének –hasonlóan a *C. albicans* Sap2 fehérjéhez- szerepe van a szérumban található komplement komponensek és immunfehérjék bontásában.



20. ábra

A vad típusú és deléciós mutáns törzsek szérumerzékenységének vizsgálata. A hővel inaktivált (A) 20% humán szérumot tartalmazó médiumban nem volt a törzsek növekedésében kimutatható különbség, míg a 20% intakt humán szérumot (B) tartalmazó közegben a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b törzs növekedése szignifikáns csökkenést mutatott (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,005$).

Hogy kiderítsük, hogy a Sapp aktivitás teljes elvesztése jár-e további szérumerzékenység növekedéssel, a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzs bevonásával megismételtük a szérumerzékenység vizsgálatát (21. ábra).



21. ábra

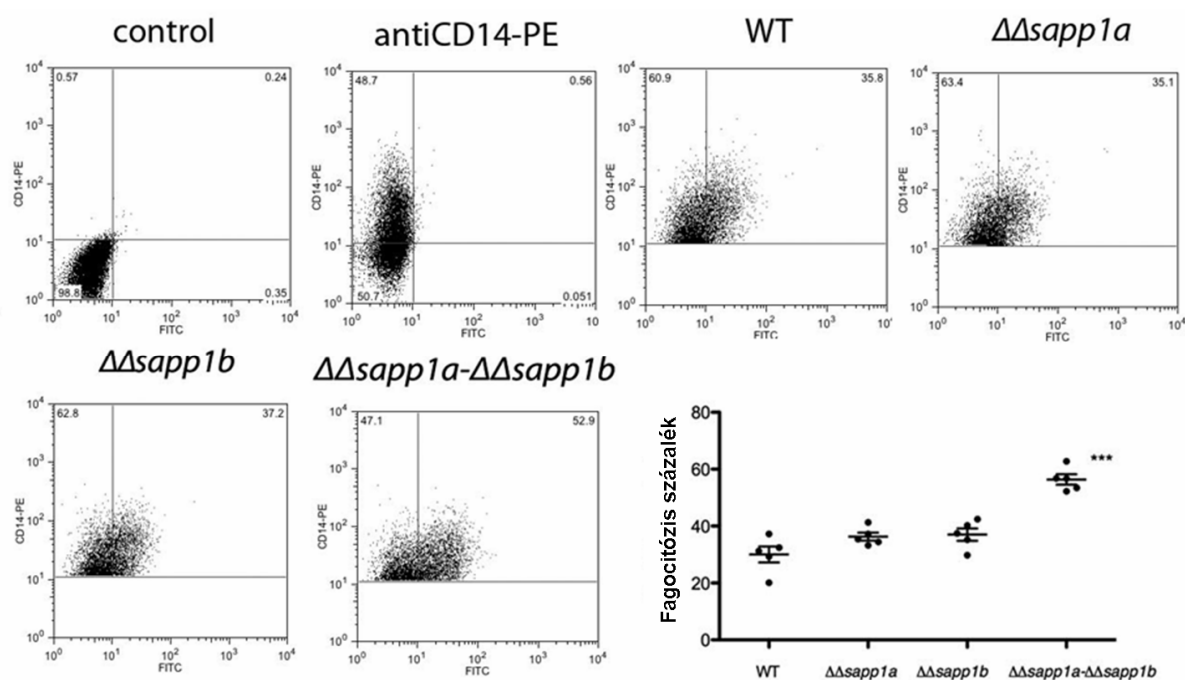
A vad típusú és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ deléciós törzs hőinaktivált humán szérumban (A) és intakt humán szérumban (B) mért növekedése. A $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzs növekedése a vad típusú törzshöz képest mind 24 óra, mind 48 óra után szignifikáns csökkenést mutatott (***: $P < 0,0001$).

A hővel inaktivált, 20% humán szérumban tenyésztett minták esetén egyik időpontban sem figyeltünk meg eltérést a sejtek növekedésében a vad típust és a deléciós mutáns törzset összehasonlítva. Az intakt humán szérumban tenyésztett minták esetén, míg a vad típusú törzs növekedése a hővel inaktivált mintákéhoz volt hasonló, addig a vad típushoz képest a Sapp negatív deléciós mutáns törzs növekedése 24 és 48 órás inkubációt követően jelentős csökkenést mutatott. Előző munkánkban, 48 órás inkubációt követően, intakt humán szérumból származó minták esetén a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ mutáns törzs vizsgálata során szintén hasonló növekedés gátlást tapasztaltunk (20. ábra). A *C. parapsilosis* fő szekretált aszpartil proteináza a Sapp1, amely, ezen eredmény alapján a szérumban lévő proteinek, valamint komplement komponensek fertőzés során történő bontásáért felelős, ezáltal segítve elő a mikroba gazdaszervezetben történő terjedését. Továbbá megállapítottuk, hogy a megmaradó proteináz aktivitás elvesztése nem növeli a mutáns sejtek szérum érzékenységét, megerősítve a *C. albicans* esetében már bizonyított feltételezést az egyes proteináz enzimek egymástól eltérő funkciójáról.

6.1.8. A vad típusú és mutáns törzsek fagocitózisának vizsgálata

A veleszületett immunitás fő effektor sejtjei a monocitákból differenciálódott makrofágok, melyek elsőként, a fertőzés korai szakaszában képesek kapcsolatba lépni és fagocitózis útján semlegesíteni a behatoló mikrobákat (Netea és mtsai. 2008). Munkánk során vizsgáltuk a vad típusú, valamint deléciós mutáns törzsek primer humán makrofágok (PBMC-DM sejtek) általi fagocitózisának hatékonyságát. A vad típusú és mutáns törzsek primer humán makrofágok általi fagocitózisának vizsgálatához áramlási citometriás mérést (FACS) alkalmaztunk. A vad típusú és $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$, $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzseket fluoreszcein-

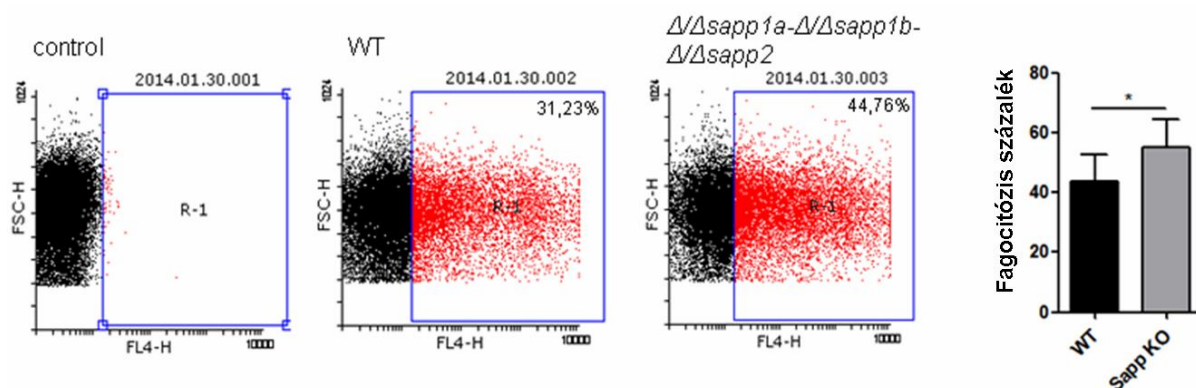
izotiocianáttal (FITC) festettük, míg a makrofág sejtek jelölése CD14-fikoeritrin (PE) antitesttel történt. Kontrollként jelöletlen, illetve CD14-fikoeritrin (PE) antitesttel jelölt primer humán makrofág sejteket alkalmaztunk. A mérés során a vad típusú törzshöz képest a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b dupla deléciós törzs sejtjeit a primer humán makrofágok jóval hatékonyabban fagocitálták (wt: 35,8% , Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b törzs: 52,9%) (22. ábra).



22. ábra

A vad típusú és deléciós törzsek fagocitózisának áramlási citometriás vizsgálata. A Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b törzs fagocitózisának százaléka szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a vad típusú törzsé (***: $P < 0,0001$).

A fertőzés előtt a vad típusú és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 mutáns törzset Alexa Fluor 647 (Life Technologies) fluoreszcens festékekkel festettük. A fertőzést ebben az esetben is ötszörös mennyiségű élesztő sejtrel végeztük el. Több donorból származó fagocitózis adatokat összesítve a vad típushoz képest a proteáz negatív törzzsel végzett koinkubáció esetén szignifikánsan nagyobb mértékű fagocitózis volt megfigyelhető (wt: 42%, Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2: 60%) (23. ábra).

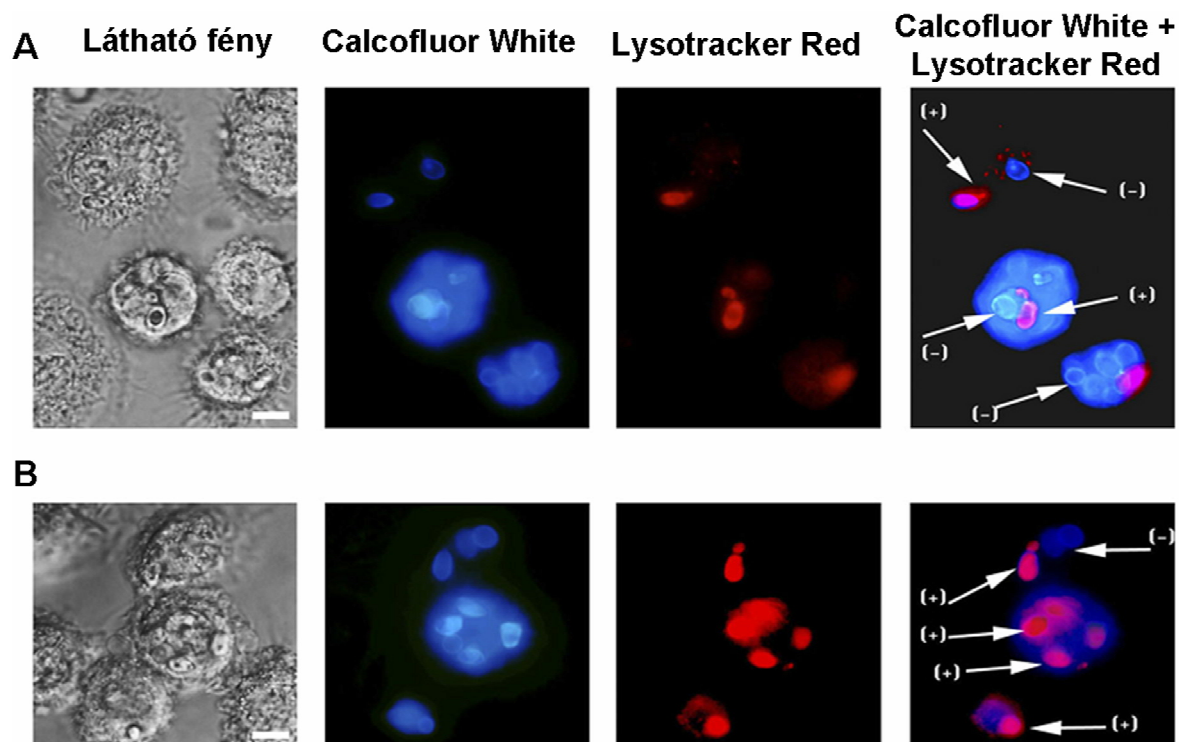


23. ábra

A vad típusú és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzsek primer humán makrofágok (PBMC-DM) általi fagocitózisa. A $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzssel való fertőzésből származó minta esetén szignifikánsan emelkedett a fagocitózis mértéke (*: $P<0,05$).

Az előző munkánkban vizsgált $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ fagocitózisa a vad típusú törzssel összevetve mintegy 40%-os emelkedést mutatott. A Sapp negatív törzs fagocitózisa szintén 40%-al volt magasabb a vad típusú sejtek bekebelezési hatékonyságánál (wt: 42%, $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$: 60%). Mivel további fagocitózis növekedést a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzs esetén nem tapasztaltunk, ez szintén arra enged következtetni, hogy *C. parapsilosis* esetén a fagocitózis gátlásában elsősorban a Sapp1 játszik szerepet.

Annak érdekében, hogy a vad típusú és a *SAPP1* deléciós mutáns törzsek esetén a fagocitózis folyamatát részleteiben tanulmányozhassuk, fluoreszcens mikroszkópos technikát is alkalmaztunk, melynek során a fagoszómák és lizoszómák kolokalizációját vizsgáltuk. Mivel a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ deléciós törzsek gazdasejtek általi fagocitózisának mértékében különbséget nem találtunk és a fagocitózis gátlásában a Sapp1 játszik szerepet, így a fago-lizoszóma kolokalizációs vizsgálatokba a vad típusú és a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzseket vontuk be. A vad típusú és $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$, $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzseket Calcofluor White (Sigma) festettük. A koinkubációs idő letelte után a humán makrofág sejteket Lysotracker Red (Invitrogen) festékkel festettük. A dupla deléciós mutáns törzs esetén szignifikánsan nagyobb mértékű fago-lizoszóma fúzió volt megfigyelhető a vad típusú törzssel összevetve ($\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ 71%, wt 30%, $P<0,0001$) (24. ábra). A $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzsek esetén a vad típusú törzssel összevetve nem mutatkozott különbség a fago-lizoszóma fúziót vizsgálva. Ezen eredmények azt támasztják alá, hogy a Sapp1 fehérjének fontos szerepe van mind a fagocitózis folyamatának gátlásában, mind a már bekebelezett gomba intracelluláris túlélése során.

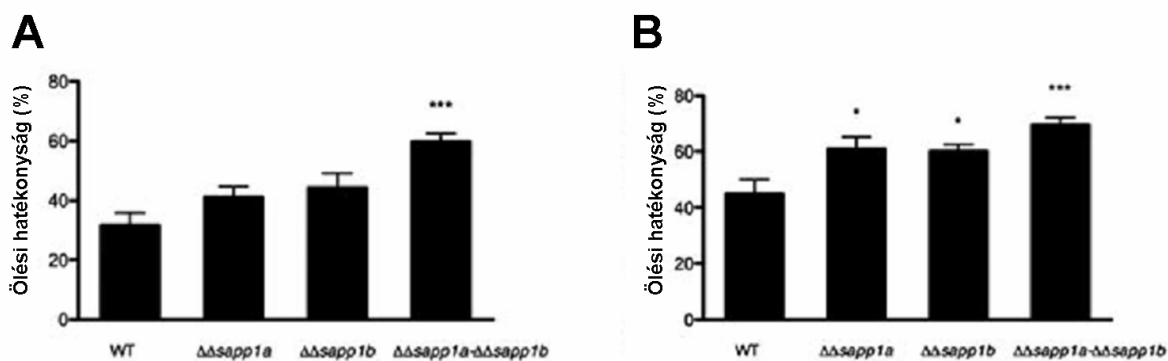


24. ábra

Fago-lizoszóma fúzió vizsgálata vad típusú (A) és $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ (B) törzs esetén. Az élesztő sejtek Calcofluor White-tal, míg a primer humán makrofágok LysoTracker Red-del festettek. A $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ törzs esetén nagyobb mértékű fago-lizoszóma fúzió volt megfigyelhető.

6.1.9. A periferiális mononukleáris sejtek (PBMC) és abból differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM) gombaölési hatékonysága

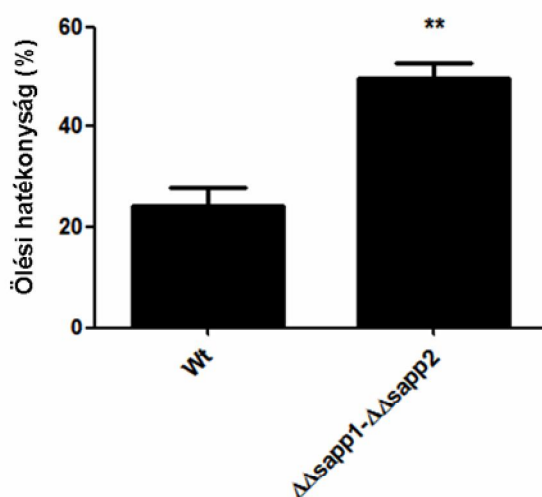
A makrofágok általi felismerést és fagocitózist követően, intracellulárisan a primer fagoszóma és lizoszóma fúzióját követően a makrofág sejteken belül megtörténhet a patogén eliminációja. Ezen ölési folyamat tanulmányozásához a *SAPP1* deléciós mutáns törzsek esetén PBMC és PBMC-DM sejtek felhasználásával mértük a vad típusú és mutáns törzsek gazdasejtek általi gombaölési hatékonyságát. A vad típusú és mutáns törzsekkel való koinkubáció után a gazda sejtek elroncsolását követően CFU meghatározást végeztünk. Mind a PBMC, mind a PBMC-DM sejtek esetén jelentős mértékű gombaölési hatékonyság volt megfigyelhető. PBMC sejtek esetén szignifikánsan hatékonyabb volt a $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ dupla deléciós mutáns törzs eliminációja a vad típussal összehasonlítva (59,69 % vs 31,6%, $P < 0,0001$) (25/A ábra). PBMC-DM sejtek esetén a vad típushoz képest a $\Delta/\Delta sapp1a$ és $\Delta/\Delta sapp1b$ törzsek gazdasejt általi eliminációja is szignifikánsan magasabbnak bizonyult (átlagosan 63,5 % -os ölési hatékonyság a deléciós mutánsok esetén és 44,9% -os ölési hatékonyság a vad típusú törzs esetén, $P < 0,001$) (25/B ábra).



25. ábra

Perifériális mononukleáris sejtek **(A)** és azokból differenciáltatott makrofágok **(B)** gombaölési hatékonyságának vizsgálata vad típusú, $\Delta\Delta sapp1a$, $\Delta\Delta sapp1b$ és $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b$ deléciós törzsek esetén. A PBMC sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben voltak képesek eliminálni a dupla deléciós mutáns törzset a vad típussal összehasonlítva (***: $P < 0,0001$), míg a PBMC-DM sejtek esetén már a $\Delta\Delta sapp1a$ és $\Delta\Delta sapp1b$ törzsek esetén is szignifikánsan nőtt a gazda sejtek általi gomba eliminációs képesség (*: $P < 0,05$).

Annak kiderítése érdekében, hogy proteináz termelés képességének elvesztése okoz-e további virulencia csökkenést, elvégeztük a vad típusú és a $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$ mutáns törzsek PBMC-DM sejtek általi gombaölési hatékonyságának vizsgálatát. Mind a vad típusú, mind a Sapp negatív mutáns törzs esetén jelentős mértékű gombaölési hatékonyság volt megfigyelhető, ám a $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$ mutáns törzs esetén a gazdasejtek általi gombaölési hatékonyság szignifikáns emelkedést mutatott (wt: 24%, $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$: 49%) (26. ábra).



26. ábra

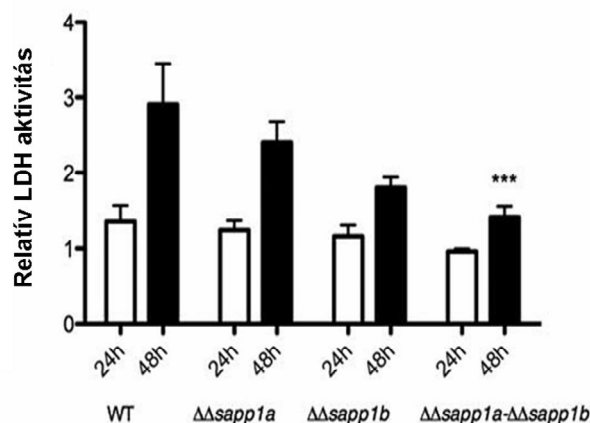
A vad típusú és $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$ törzsek primer humán makrofágok általi eliminációjának mértéke. A deléciós mutáns törzs eliminációjának mértéke szignifikánsan emelkedett(**: $P < 0,01$).

Ebben az esetben a $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$ mutáns törzssel szembeni gazdasejtek ölési hatékonysága mintegy kétszerese volt a vad típusú törzssel összevetve. Előző munkánk

során a PBMC-DM sejtek vad típussal szembeni ölés hatékonysága 44,9% volt, míg a $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ törzzsel szembeni ölési hatékonyság 63,5%-nak adódott, amely mintegy 1,4-szeres hatékonyság növekedésnek felel meg (25/B ábra). Ezen eredmény szerint a Sapp negatív mutáns törzzsel szembeni gombaölési hatékonyság további növekedést mutatott az előző fejezetben tárgyalt $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ törzs gombaölési hatékonyságához képest, amely felveti a Sapp1-től eltérő szekretált proteinázok esetleges sejten belüli túlélésben betöltött szerepének lehetőségét, ennek részletesebb vizsgálata azonban további kísérleteket kíván.

6.1.10. A gazda sejtek károsodásának mérése

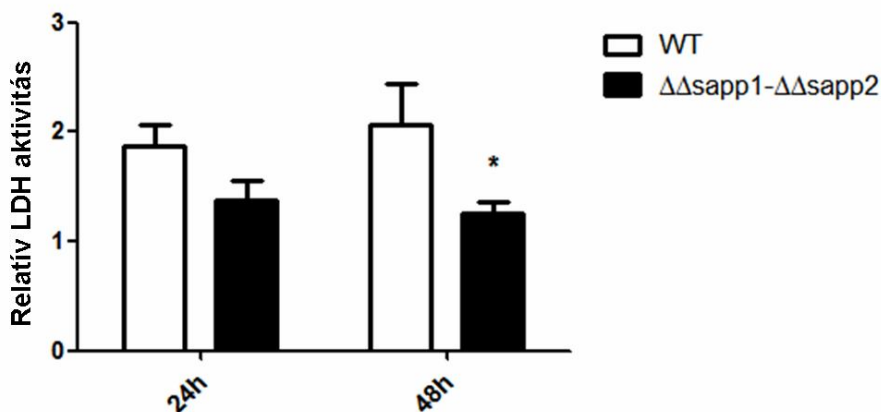
Számos patogén gombafaj esetén kimutatták, hogy különböző stratégiák állnak rendelkezésre a mikroba számára, amelyekkel sikeresen képesek túlélni a makrofágok általi bekebelezést (Seider és mtsai. 2010). Ezen túlélési stratégiák sok esetben a gazdasejt pusztulásához vezetnek. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataink kimutatták, hogy több fago-lizoszóma képződött a $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ deléciós mutáns törzzsel fertőzött minta esetén, amely arra enged következtetni, hogy a Sapp1 fehérjének szerepe van a mikroba sejten belüli túlélésében. Mindezeket alapul véve megvizsgáltuk a vad típusú és mutáns törzsek gazdasejt károsító képességét. Ahhoz, hogy a vad típusú és deléciós mutáns törzsek gazdasejt károsodásának mértékét mérjük, primer humán PBMC-DM sejteket fertőztünk vad típusú és deléciós mutáns törzsekkel. 24 és 48 óra koinkubáció elteltével a felülszórókból mért laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitásának mértékéből következtettünk a gazdasejtek károsodásának mértékére. 24 órás koinkubáció után nem volt megfigyelhető változás a vad típusú, illetve a deléciós mutáns törzsekkel fertőzött gazdasejtek károsodásának mértékében. 48 óra koinkubációs időtartam után a vad típussal fertőzött gazdasejtek esetén volt megfigyelhető a legnagyobb mértékű gazdasejt pusztulás. A $\Delta/\Delta sappa1a$ és $\Delta/\Delta sappa1b$ törzsek esetén a károsodás kisebb mértékű volt, ám nem szignifikáns mértékben. A $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ dupla deléciós mutáns törzzsel való fertőzés esetén a gazdasejtek károsodása csökkent mértékűnek bizonyult a vad típusú törzshöz képest (27. ábra).



27. ábra

A vad típusú és $\Delta\Delta sapp1a$, $\Delta\Delta sapp1b$ és $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b$ törzsek gazdasejt károsító képessége 24 és 48 óra eltelté után. A $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b$ törzs gazdasejt károsító képessége 48 óra elteltével a vad típushoz képest szignifikánsan kisebbnek bizonyult (***: $P < 0,0001$).

Munkánk további részében vizsgáltuk a vad típusú, valamint a Sapp negatív törzs gazdasejt károsító képességét is, szintén PBMC-DM sejtek felhasználásával. A vizsgálat során 24 óra koinkubáció elteltével a vad típusú és a $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$ deléciós mutáns törzs által okozott gazdasejt károsodásának a mértékében nem mutatkozott különbség. 48 óra koinkubáció esetén, hasonlóan az előzőekben leírtakhoz, a vad típusú törzs szignifikánsan nagyobb mértékben károsította a gazdasejteket, mint a deléciós mutáns törzs (28. ábra).



28. ábra

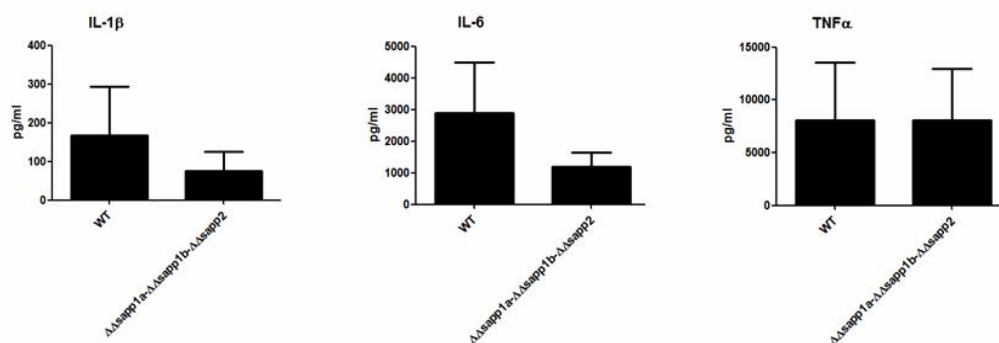
A vad típusú és $\Delta\Delta sapp1a-\Delta\Delta sapp1b-\Delta\Delta sapp2$ deléciós mutáns törzsek gazdasejt károsító képessége. 48 óra koinkubáció után a deléciós mutáns törzs által okozott károsodás mértéke szignifikánsan kisebbnek bizonyult a vad típussal összevetve (*: $P < 0,05$).

Az adatokat összevetve 24 óra koinkubációt követően sem a vad típus, sem a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b, sem a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek gazdasejt károsító képességében nem mutatkozott különbség. 48 óra koinkubációt követően a vad típushoz képest mind a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b, mind a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek gazdasejt károsító képessége szignifikánsan kisebb volt, ám a két deléciós törzset összevetve a gazdasejtek károsodásában különbség nem mutatkozott. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázai közül a Sapp1 az, amely gazda sejtjeinek károsításában a legjelentősebb szereppel bír.

6.1.11. Humán PBMC-DM sejtek vad típusú és Sapp negatív törzsekkel való fertőzésre adott immunválasza

C. albicans-ban egy tanulmány vizsgálta különböző rekombináns Sap fehérjék által kiváltott proinflammatorikus citokinek termelődésének változását primer monocita sejteken (Pietrella és mtsai. 2010). Ezen tanulmányban kimutatták, hogy a Sap1, Sap2 és Sap6 fehérjék szignifikánsan megnövelték a monociták által termelt IL-1 β , TNF- α és IL-6 mennyiségét. Ezen kívül a *C. albicans* Sap3 fehérjéje szignifikánsan növelte a primer monociták által termelt IL-1 β és TNF- α mennyiségét.

Annak kiderítésére, hogy *C. parapsilosis* esetén a szekretált aszpartil proteinázoknak van-e valamilyen hasonló immunmoduláló szerepe, humán PBMC-DM sejtek vad típusú és Sapp negatív mutáns törzsek általi fertőzése során vizsgáltuk a gazdasejtek által termelt proinflammatorikus citokinek szintjét. A humán gazdasejteket ötszörös mennyiségű élesztő sejtrel fertőztük, majd 24 órás koinfekció után enzimmötött immunoszorbens assay (ELISA) módszerrel vizsgáltuk a gyulladásos citokinek termelődésének mennyiségét. A vizsgálat során a proinflammatorikus citokinek: IL-1 β , IL-6 és TNF α mennyiségi vizsgálatát végeztük el (29. ábra).



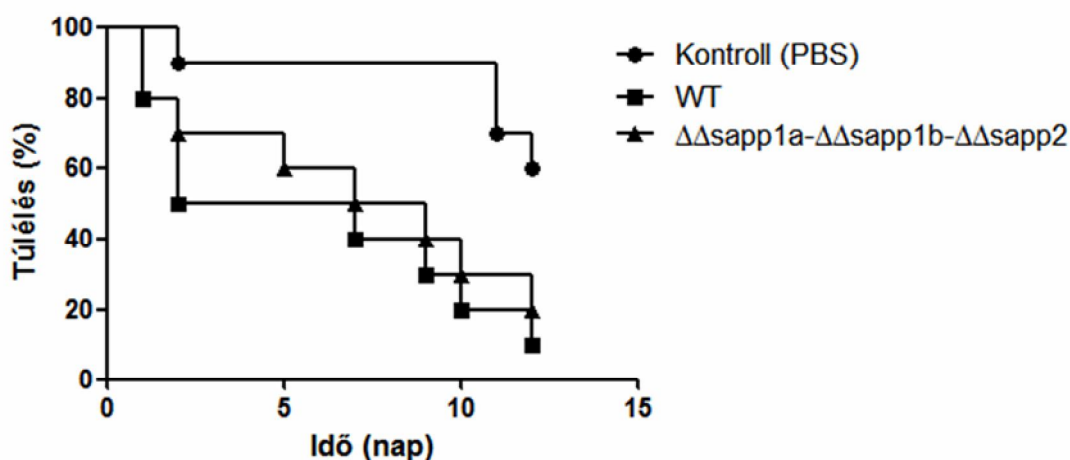
29. ábra

Humán PBMC-DM sejtek vad típusú és deléciós mutáns törzzsel való fertőzése során termelt proinflammatorikus citokinjeinek mennyisége.

Eredményeink azt mutatják, hogy az IL-1 β , valamint az IL-6 termelődése, bár a vad típusú törzzsel összevetve a deléciós mutáns törzs esetén csökkenést mutatott, ám a csökkenés mértéke nem volt szignifikáns mértékű. A TNF α termelődése esetén a vad típussal, illetve a deléciós mutánssal fertőzött minták esetén különbséget nem tapasztaltunk. Ezen előzetes eredmények azt mutatják, hogy PBMC-DM sejtek esetén a Sapp fehérjéknek a gyulladásos válasz kialakulásának kezdeti szakaszában lehet immunmoduláló szerepe, ám ez a hatás elhanyagolható. A *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázainak immunmoduláló szerepének teljes tisztázása érdekében a PBMC-DM sejtek mellett más modellrendszerek (pl. epitéliális sejtek, sejtvonalak) jövőbeli alkalmazása, valamint az anti-inflammatorikus citokinek vizsgálata szintén szükséges.

6.1.12. Nagy viaszmony (*Galleria mellonella*) lárvák túlélésének *in vivo* vizsgálata

A nagy viaszmony (*G. mellonella*) lárvák jellemző tulajdonsága, hogy az adaptív immunrendszerre jellemző sejtes elemekkel nem, csupán hemocitákkal rendelkeznek, melyek ősi fagocita sejtek, ezáltal az organizmus alkalmas modellrendszert jelentenek a veleszületett immunitás *in vivo* tanulmányozására. A nagy viaszmony továbbá egy egyszerű, könnyen kezelhető modellrendszert biztosít, melynek alkalmazásával *in vivo* túlélési vizsgálatok könnyen kivitelezhetőek, akár nagy számú mikroba törzs alkalmazásával (Jacobsen 2014). Munkánk során *G. mellonella* lárvák *in vivo* túlélését vizsgáltuk. A vizsgálat során tíz-tíz egyedet fertőztünk vad típusú és $\Delta\Delta\text{sapp1a-}\Delta\Delta\text{sapp1b-}\Delta\Delta\text{sapp2}$ deléciós mutáns törzzsel, kontrollként pedig tíz egyedet PBS pufferrel injektáltunk, majd naponta vizsgáltuk a fertőzött egyedek túlélését (30. ábra).

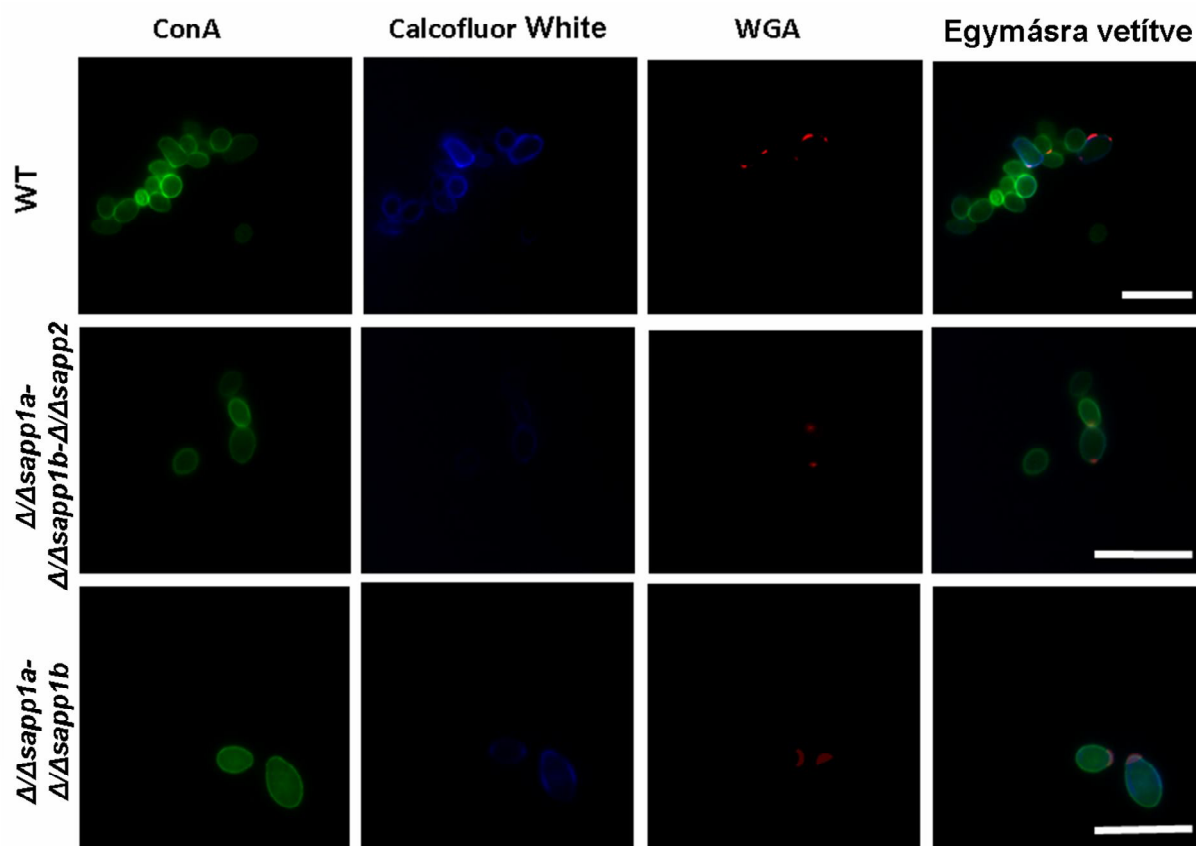


30. ábra
G. mellonella lárvák *in vivo* túlélésének vizsgálata

Bár a vad típusú törzzsel és a deléciós mutáns törzzsel fertőzött csoportot összehasonlítva nem kaptunk szignifikáns különbséget a lárvák túlélésében, egyetlen időpontban sem, ám ezen modellszervezet alkalmazása csupán mint előkísérlet volt további *in vivo* túlélési kísérletekhez. További munkánk során tervezzük más modellrendszerek alkalmazását *in vivo* túlélési vizsgálatokhoz.

6.1.13. A *C. parapsilosis* vad típusú, Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek sejtfalösszetételének vizsgálata.

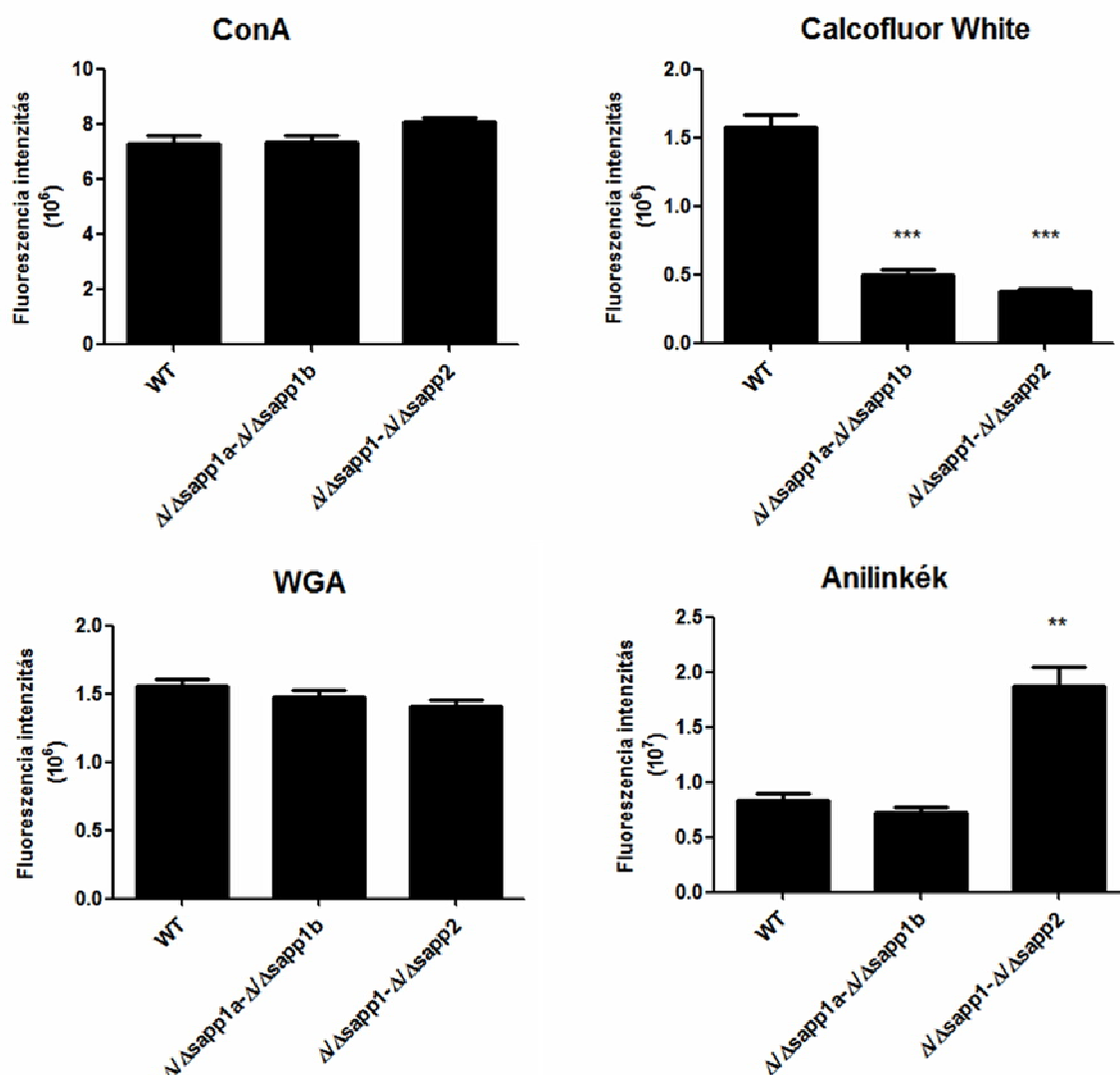
Prof. Leonardo Nimrichter csoportjával együttműködve, módunk nyílt a vad típusú, a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek sejtfalszerveződésének vizsgálatára. Ezen vizsgálatok során fluoreszcens mikroszkópos módszerrel vizsgáltuk a sejtfal összetevők egyes komponenseinek mennyiségét. Mennyiségi adatokra a fluoreszcencia intenzitás mértékéből tudtunk következtetni. A mannoproteinek mennyiségének vizsgálatához ConA festéket, a kitin tartalom méréséhez Calcofluor White festéket, valamint az élesztő osztódása során keletkező szeptumok vizsgálatához WGA fluoreszcens festéket alkalmaztunk (31. ábra).



31. ábra

A vad típusú, a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b és Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 törzsek sejtfalszerveződésének fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata.

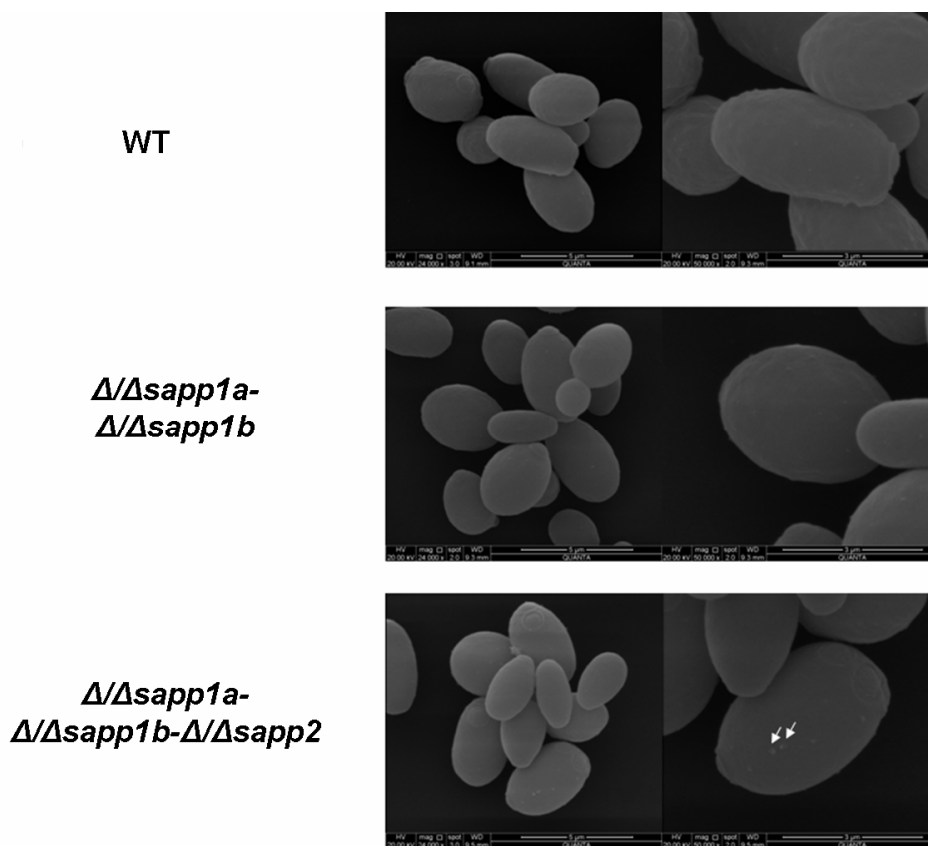
Eredményeink azt mutatják, hogy a mannoproteinekre specifikus ConA festék és az osztódás során képződő szeptumokra specifikus WGA festék fluoreszenciájában nem mutatkozott különbség, addig a vad típushoz képest a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzsek esetén a Calcofluor White intenzitása jelentősen csökkent, amely azt mutatja, hogy a két deléciós törzs sejtfalának kitin tartalma jelentős mértékben lecsökkent. A vad típusú és deléciós mutáns törzsek sejtfalának glükán tartalmának meghatározásához anilinkék festést végeztünk. Érdekes módon a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzs esetén a glükán tartalom jelentősen nagyobb volt, mint a vad típusú és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzs esetén, amely jól demonstrálja, hogy a szekretált aszpartil proteinázok jelentős szerepet töltenek be a mikroba sejtfal integritásának fenntartásában (32. ábra).



32. ábra

A vad típusú, a $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzsek sejtfal komponensekre specifikus festékek fluoreszcencia intenzitásai (**: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

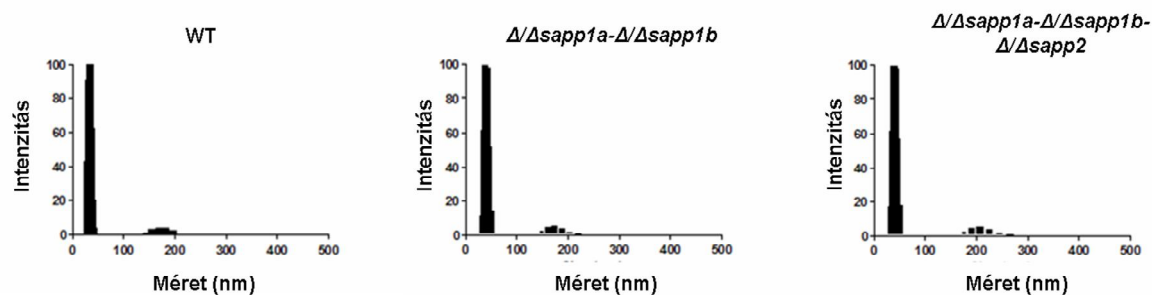
Módunk nyílt ezen felül szintén Prof. Leonardo Nimrichter csoportjának köszönhetően scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzésére a vad típusú, valamint a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ és $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ - $\Delta/\Delta sapp2$ törzsek bevonásával. Előzetes vizsgálataink azt mutatták, hogy a mikroba sejt falán található apró kitüremkedések, ún. „pimple”-k száma a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ - $\Delta/\Delta sapp2$ törzs esetén kevesebbnek bizonyult a vad típusú törzsszel összevetve (33. ábra). Ezen sejt falai képleteket *C. ablicans*-ban Anderson és munkatársai írták le, a mikroorganizmus white-opaque átmenete során (Anderson és mtsai. 1990). Ezen képletek létrejötte valószínűleg az eltérő sejt fal szerkezet miatt jöhet létre, ám kialakulásuk pontos mechanizmusa ma sem ismeretes.



33. ábra

A vad típusú és a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$, valamint $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ - $\Delta/\Delta sapp2$ törzsek scanning elektronmikroszkópos vizsgálata.

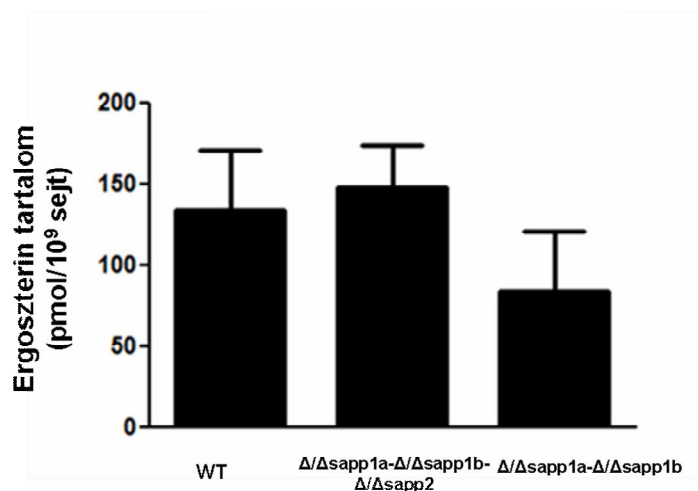
Ezen jelenség egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy a vad típusú törzshöz képest a deléciós mutáns törzsek esetén a szekréció folyamata zavart szenved az eltérő sejt fal összetételéből adódóan. Ennek tisztázására elvégeztük a vad típusú és mutáns törzsek vezikula frakcióinak méret szerinti analízisét (34. ábra), valamint a törzsek sejt membránjában található ergosterin tartalom meghatározását (35. ábra).



34. ábra

A vad típusú, a $\Delta/\Delta\text{sapp1a}-\Delta/\Delta\text{sapp1b}$, valamint a $\Delta/\Delta\text{sapp1a}-\Delta/\Delta\text{sapp1b}-\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzsek vezikula analízise.

A törzsek vezikuláinak méret szerinti analízise nem mutatott különbséget a vad típusú és deléciós mutánsok között. Vizsgáltuk a törzsek membránjában található ergoszterin tartalmat, de szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk (35. ábra).



35. ábra

A vad típusú és mutáns törzsek ergoszterin tartalma.

Mindezen eredmények arra mutatnak rá, hogy bár egyetlen *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteináz sem tartalmaz glikozil foszfatidil-inozitol oldalláncot, így a mikroba sejtfalába beépülni kovalens módon nem képes, mégis jelentős szerepet játszik a mikroba sejtfalának felépítésében. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a szekretált aszpartil proteinázoknak nagy szerepük lehet a gomba sejtfalának belső, kompakt rétegének kialakításában és fenntartásában, mivel ezen proteinázok hiányában jóval kevesebb mennyiségű kitin és jóval nagyobb mennyiségű glükán tartalom figyelhető meg, így a mutáns törzsek sejtfala valószínűleg jóval lazább szerkezetű, mint a vad típus sejtfala.

6.2. Egy lehetséges overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása *C. parapsilosis*-ban

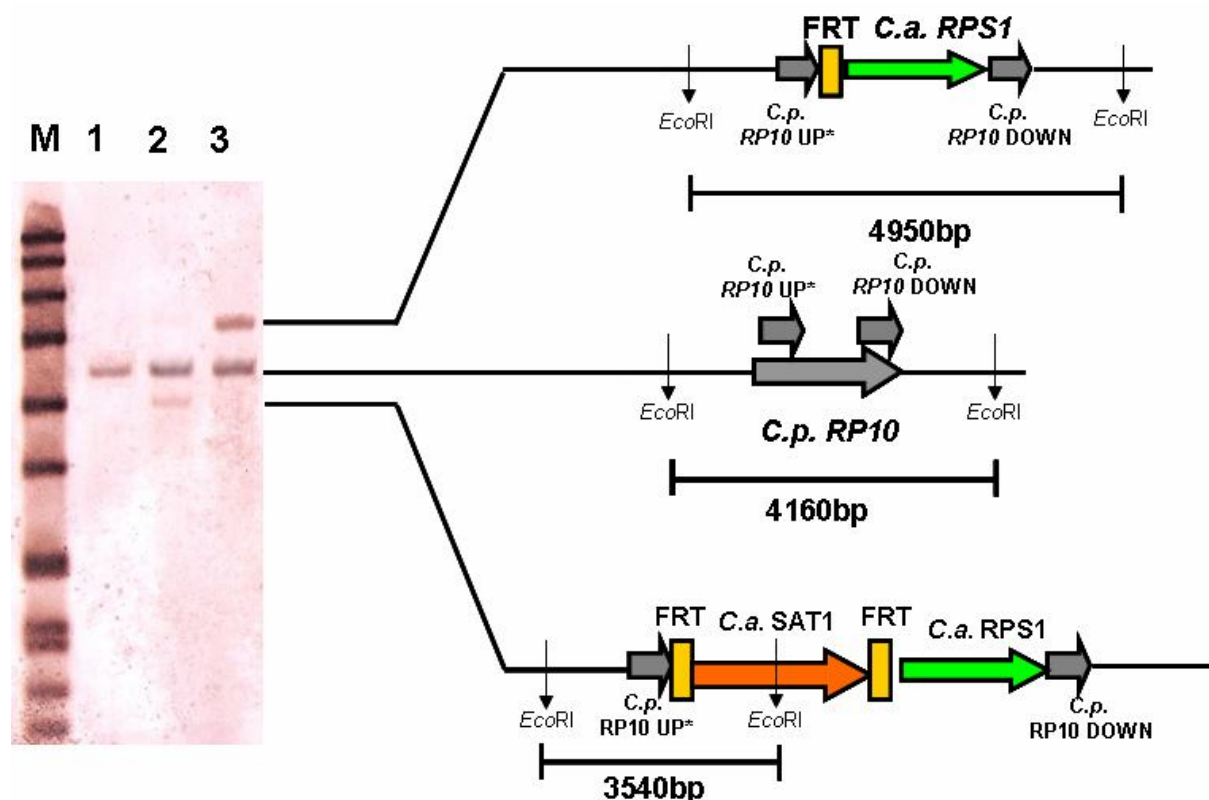
A CUG kládba tartozó *Candida* fajok többsége diploid szervezet, melyek szexuális ciklussal nem rendelkeznek. A szexuális ciklus hiányából adódóan egy adott gén deléciója minden módszer esetén két transzformálás során valósítható meg, amelynek kivitelezése sok esetben jelentős időt vehet igénybe. Több kópiában jelen lévő gének esetén a deléció folyamata még ennél is több időt vesz igénybe. Erre lehet példa az előző fejezetben ismertetett *SAPPI* gén deléciója, melynek során a két kópia deletálása több, mint egy évet vett igénybe és a deléciós stratégia sokszori újratervezése volt szükséges. További hátránya a géndeléciós eljárásoknak, hogy a deletált törzs bizonyos esetekben letális fenotípust mutat, vagy más esetekben, ha egy géncsalád egyik génjét deletáljuk, látható fenotípusos változás nem történik, mivel az adott géncsalád többi tagja kompenzálni képes az elvesztett gén funkcióját. Ezen problémák áthidalására nyújthat megoldást egy megbízható, jól működő overexpressziós stratégia kidolgozása.

Napjainkra *C. parapsilosis* esetén számos, jól alkalmazható géndeléciós eljárás került kidolgozásra, ám overexpressziós mutáns törzsek létrehozása nem történt meg. Munkánk során célunk volt egy *C. albicans*-ban jól működő overexpressziós rendszer *C. parapsilosis*-ra adaptálása. Ezen rendszer kidolgozásához Cabral és munkatársainak munkája adta az alapot (Cabral és mtsai. 2012). A *C. albicans*-ban működő rendszer az *RP10* (más néven *RPS1*) lokuszt használja, mint genetikailag semleges lokuszt, amelybe a túlműködtetni kívánt gént inszertálják. A túlműködtetni kívánt gén egy megfelelően erős promoter szabályozása alatt áll.

Az overexpressziós rendszer ezen kívül kihasználja a Gateway (Invitrogen) klónozási rendszer specificitását és gyorsaságát. Ezen klónozási rendszer helyspecifikus rekombináció segítségével képes az amplifikált ORF-eket az adott vektorba inszertálni. Az első klónozási lépés során az „entry clone” létrehozása történik meg, az ún. BP klonáz enzim segítségével. Az entry klón létrehozása után az adott ORF-et az entry vektorból a „destination vektor”-ba szükséges átvinni, szintén egy specifikus rekombináz, az ún. LR klonáz segítségével. A destination vektor felhasználástól függően sokféle lehet. Mind a BP, mind az LR klonáz egy specifikus rekombináz, melyeket a λ -fágból tisztítottak (Hartley és mtsai. 2000).

6.2.1. *C. parapsilosis* overexpresszióra alkalmas fogadó törzsének létrehozása.

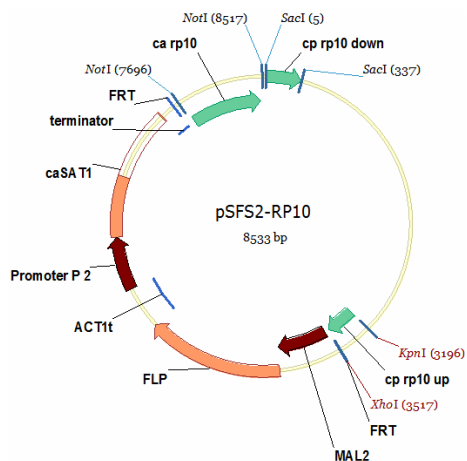
Ahhoz, hogy egy *C. albicans*-ban jól működő overexpressziós rendszert sikerrel adaptáljunk *C. parapsilosis*-ra, elsőként a *C. albicans* *RP10* régióját integráltuk a *C. parapsilosis* CLIB leucin auxotróf törzsébe (36. ábra).



36. ábra

A *C. parapsilosis* fogadó törzsének előállítása CLIB *leu*- háttéren. M: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche), 1.: *C. parapsilosis* CLIB *leu*- 2.: *leu2Δ::FRT/leu2Δ::FRT::cprp10Δ::FRT-SAT1-FRT-caRP10/cpRP10* 3.: *leu2Δ::FRT/leu2Δ::FRT::cprp10Δ::FRT-caRP10/cpRP10*

A *C. albicans* *RP10* régiójának integrálásához a pSFS2 vektort használtuk fel (a vektort Joachim Morsscauser bocsátotta rendelkezésünkre). Az üres pSFS2 vektorba ez esetben a *C. parapsilosis* *RP10* régiójának upstream részét (319 bp) a vektor *KpnI* – *XhoI* helyére klónoztuk. Ugyanezen régió downstream részét (326 bp) a vektor *SacI* helyére klónoztuk. A *C. albicans* *RP10* régióját (770 bp) közvetlenül a vektoron elhelyezkedő *caSAT1* kazetta mögé, *NotI* helyre klónoztuk be (37. ábra).



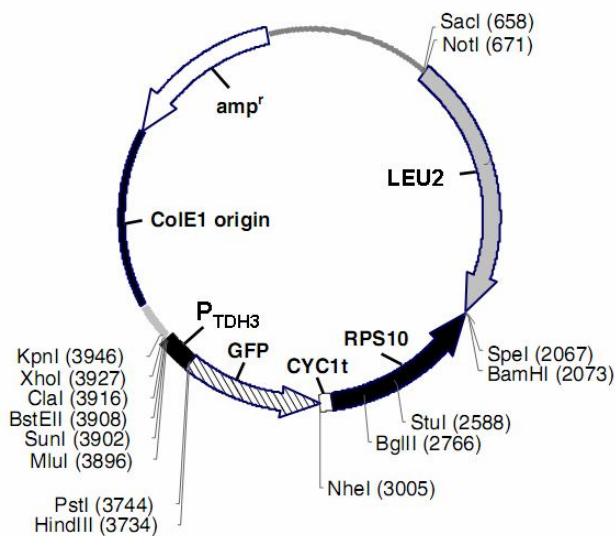
37. ábra

A *C. parapsilosis* fogadó törzséhez felhasznált konstrukció

A *C. parapsilosis* *RP10* upstream és downstream régióit felhasználva a korrekt integráció lehetségessé vált. A *caSAT1* kazetta eliminációja után, a NAT szenzitív transzformáns heterozigóta formában, a *C. parapsilosis* *RP10* génjének egyik alléljába integráltan hordozza a *C. albicans* *RP10* régióját, ezáltal ezen transzformánsnak ez az allélje képes fogadni a *C. albicans*-ban is működő overexpressziós vektort.

6.2.2. Az elkészített *C. parapsilosis* fogadó törzs GFP transzformációja

A *C. parapsilosis* fentebb leírt módszerrel elkészített fogadó törzsének teszteléséhez, azaz annak kiderítéséhez, hogy a törzs képes-e fogadni az overexpressziós konstrukciókat, egy azokhoz nagyon hasonló, GFP riporter gént tartalmazó vektort használtunk fel (38.ábra).

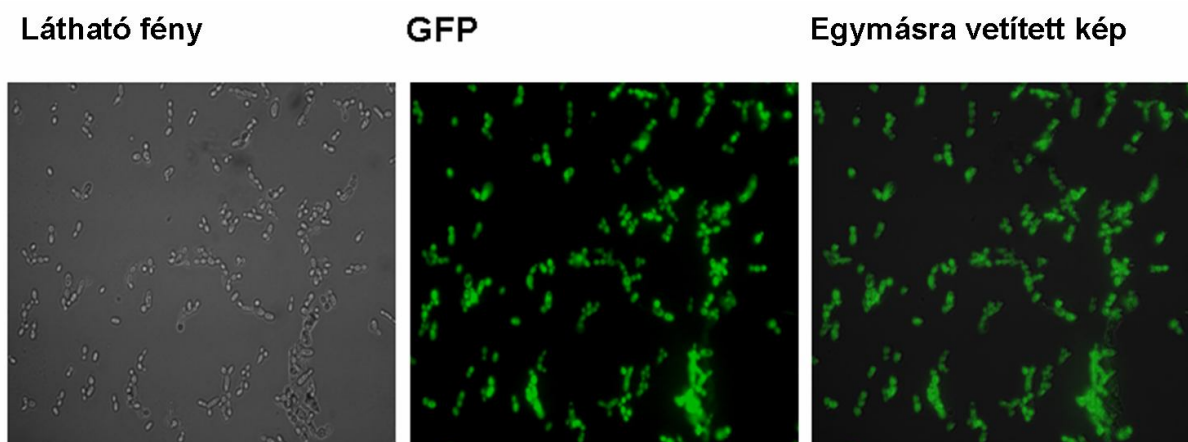


38. ábra

A *C. parapsilosis* fogadó törzsének teszteléséhez felhasznált Clp10- pTDH3-GFP konstrukció.

Az eredeti GFP vektort Barelle és munkatársai alkották meg (Barelle és mtsai. 2004). A konstrukción található TDH3 promoter egy erős, konstitutív promoter, amely biztosítja a GFP riporter gén kifejeződését. A konstrukcióra jellemző, hogy a *C. albicans* *RP10* régiója egy mesterségesen beépített *StuI* hasítóhelyet tartalmaz. Az eredeti vektor *URA3* szelekciós markert tartalmazott, amelyet a szelekció biztosítása érdekében *C. dubliniensis*-ből származó *LEU2* markerre (2266 bp) cseréltünk, amely markert *NotI* – *SpeI* helyekre klónoztunk.

A vektor szelekciós markerének cseréje után, annak *SpeI* enzimmel történő linearizációját követően az így előkészített GFP konstrukciót a *C. parapsilosis* fogadó törzsébe transzformáltuk (39. ábra).



39. ábra

A *C. parapsilosis* fogadó törzsének Clp10-pTDH3-GFP-LEU2 konstrukcióval való transzformánsa.

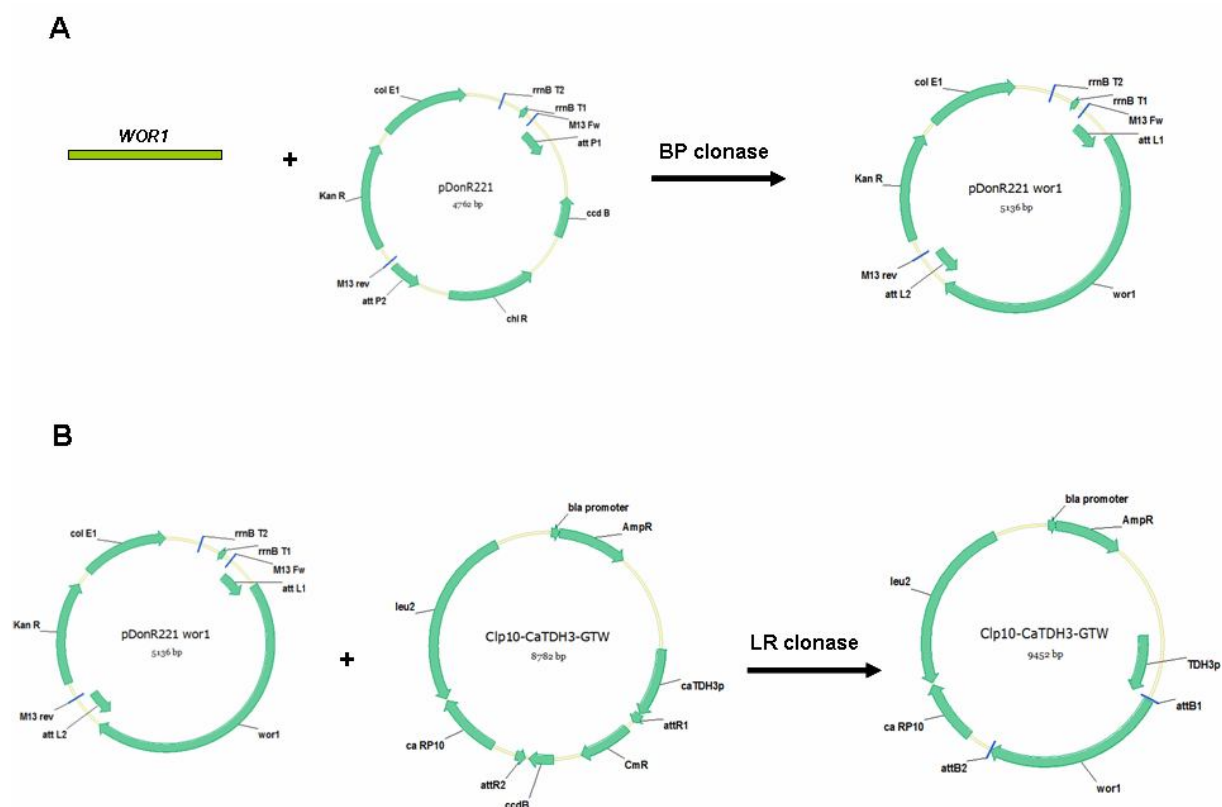
A transzformációt követően a transzformánsokat fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A GFP pozitív transzformánsok minden sejtje azonos módon expresszálta a GFP proteint. Ez az eredmény bebizonyította, hogy az elkészített, *C. albicans* *RP10* gént hordozó fogadó törzs alkalmas háttérrel biztosít overexpressziós mutánsok létrehozásához.

6.2.3. Az első overexpressziós vektor létrehozása

Overexpressziós vektorok létrehozásához az Invitrogen által kifejlesztett nagy specificitással rendelkező gateway rendszert kívánjuk alkalmazni. A gateway rendszer előnye, hogy ellentétben a klasszikus klónozási lépésekkel – restrikciós emésztés, ligálás – ezen rendszer a klónozási lépéshez helyspecifikus rekombinázoikat használ, melyek a λ -fágból származnak. A gateway klónozásra jellemző, hogy két vektort: egy „entry” és egy „destination” vektort alkalmaz. Az entry vektor egy klónozó vektor, amely az adott fragment felszaporítását szolgálja, míg a destination vektor egy célzott, felhasználástól függően egyedi szekvenciájú vektor. Az entry vektor létrehozása a BP reakció során valósul meg. A klónozni kívánt

fragment két végén található attB1 és attB2 rekombinációs felismerő helyek, valamint az üres entry vektor attP1 és attP2 felismerő helyek szolgálnak az irányított rekombináció helyéül. Az üres entry vektor tartalmazza a *ccdB* gént, amely egy *E. coli* DNS giráz inhibitor, ezáltal az üres vektor toxikus a laborokban használatos *E. coli* törzsekre. Az elkészült, kívánt fragmentet tartalmazó entry vektort ezután az LR reakció során lehet felhasználni. Ezen reakcióban a felhasználni kívánt fragment destination vektorba történő rekombinációja zajlik le.

Munkánk során a *WOR1* gén gateway rendszerrel való klónozását, illetve esetleges overexpresszáltatását kívántuk végrehajtani. A *WOR1* gén *C. albicans* esetén felelős a withe-opaque átmenetért, az α és α sejteket stabilan opaque fázisban képes tartani (Huang és mtsai. 2006). Ezen gén overexpresszáltatása érdekében a *C. parapsilosis* attB1 és attB2 rekombinációs helyeket tartalmazó *C. parapsilosis* *WOR1* ORF-et a pDONR 221 vektorba (Invitrogen) klónoztuk. A sikeres klónozást követően LR reakció során az ORF-et a pTDH3-GTW-LEU2 destination vektorba vittük át (40. ábra).

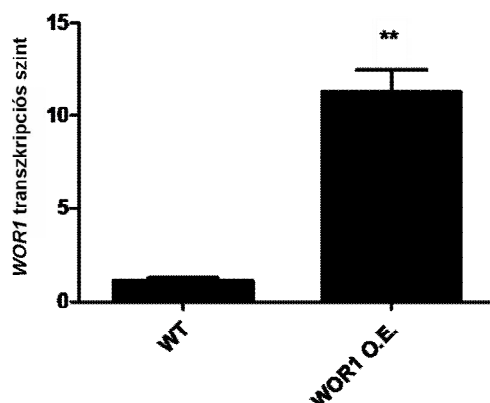


40. ábra

A *WOR1* ORF-ének gateway klónozása. **A:** BP klonáz reakció, **B:** LR klonáz reakció.

Az elkészített, *WOR1* gént hordozó „destination” vektorral ezután elvégeztük a *C. parapsilosis* fogadó törzsének transzformációját. A beépült vektor egy igen erős, konstitutív

promotert tartalmaz. A transzformánsok *WOR1* génjének transzkripció szintjét qRT-PCR segítségével vizsgáltuk (41. ábra). A Kvantitatív Real-Time PCR eredmények szerint a transzformáns telepek esetén a vad típushoz képest a *C. parapsilosis* *WOR1* expresszió szintje szignifikánsan, mintegy tízszeresére emelkedett (**: $P < 0,01$). A kapott eredmény azt mutatja, hogy az ezen a módon létrehozott fogadó törzs képes működtetni az integrált gént, amely a TDH3 konstitutív promoter szabályozása alatt konstitutívan kifejeződik.



41. ábra

A *C. parapsilosis* fogadó törzsének *WOR1* gént hordozó overexpressziós transzformánsának génexpressziós vizsgálata. A transzformánsokban a *WOR1* gén expressziója szignifikánsan emelkedett (**: $P < 0,01$).

A kapott eredmény jól mutatja, hogy *C. parapsilosis* esetén mind a létrehozott fogadó törzs, mind az alkalmazott overexpressziós stratégia jól alkalmazható későbbi munkák során overexpressziós mutánsok létrehozásához, lehetőséget biztosítva ezzel egy adott gén funkciójának alaposabb tanulmányozásához, ezzel együtt a gazda-patogén kölcsönhatás mélyebb megértéséhez.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Candida* fajok által kiváltott megbetegedések az elmúlt három évtized során egyre növekvő egészségügyi problémát jelentenek. Bár ezen élesztők többsége a normál, humán mikroflóra része, bizonyos körülmények között a bőrt, nyálkahártyát, vagy az egész szervezetet érintő, szisztémás fertőzések kiváltására képesek. Gyakran hozhatók összefüggésbe nozokomiális fertőzésekkel, így az elhúzódó kórházi kezelés, nyílt/égési sérülések, valamint koraszülött csecsemők esetén az alacsony születési súly szintén a rizikófaktorok között szerepel. Epidemiológiai vizsgálatok szerint, bár a felnőtt lakosság körében a kandidiázisos esetek legnagyobb hányadát a *C. albicans* okozza, addig újszülöttek körében a kandidiázisos kórképek kialakulásáért felelős ágensek körében a *C. parapsilosis* sok esetben a *C. albicans* által kiváltott esetszámot is felülmúlja. 2005-ben a *C. parapsilosis*-t, genetikai varianciája alapján három csoportra osztották: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*. A három faj közösen a *C. parapsilosis sensu lato* csoportot alkotja. Bár az ezredforduló óta a nem-*albicans* fajok (újszülöttek körében főként a *C. parapsilosis*) által okozott megbetegedések aránya növekvő tendenciát mutatnak, azok patomechanizmusáról, virulencia faktorairól kevés ismeret áll rendelkezésünkre. *C. parapsilosis* által kiváltott fertőzések esetén jelentős szerep jut a mikroba által szekretált hidrolitikus enzimeknek, főként a lipázoknak és szekretált aszpartil proteinázoknak. Korábbi tanulmányok lipáz deficiens *C. parapsilosis* törzs esetén jelentős virulencia csökkenést mutattak ki. Szekretált aszpartil proteinázok esetén a *C. parapsilosis* két fő proteinázának, a Sapp1 és Sapp2 fehérjének enzimológiai tisztítása és jellemzése történt meg. Bár *C. parapsilosis* esetén napjainkra számos géndelécíós módszert dolgoztak ki, ám *C. albicans*-al ellentétben overexpressziós módszer ezen mikroba esetén nem áll rendelkezésre. Ezen okokból kifolyólag munkánk kezdetén a következő célkitűzéseket tettük: célunk volt 1.: a *C. parapsilosis* fő szekretált aszpartil proteinázának, a Sapp1 fehérjének virulenciában betöltött szerepének tisztázása, 2.: a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázainak virulenciában betöltött általános szerepének tisztázása egy Sapp negatív törzs létrehozásával, valamint 3.: egy *C. parapsilosis*-ra optimalizált overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása. Az említett célkitűzések eredményei a következők.

7.1. A *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteináz 1 (Sapp1) virulenciában betöltött szerepének vizsgálata.

Munkánk kezdetén a *C. albicans* által szekretált aszpartil proteinázok (Sap) virulenciában betöltött szerepe régóta tanulmányozott volt (Hube and Naglik 2001). *C. albicans*-ban végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy ezen fajban a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepe igen sokrétű, számos, a gazdaszervezetben megtalálható strukturális és antimikrobiális proteinek bontására képesek, ezáltal elősegítve a mikroba szervezeten belüli terjedését (Hube 1998, Naglik és mtsai. 2003).

C. parapsilosis esetén ebben az időben (2009) Olga Hruskova-Heidingsfeldova és munkatársai sikeresen azonosították, tisztították és jellemezték a *C. parapsilosis* Sapp1 és Sapp2 fehérjéit (Dostal és mtsai. 2005, Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009), ám a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepéről információ nem állt rendelkezésre. Az enzimológiai vizsgálatok szerint a mikroba fő szekretált aszpartil proteináza a Sapp1 fehérje, amely induktív körülmények közt legalább egy nagyságrenddel nagyobb mértékben termelődik, mint a Sapp2 fehérje, valamint szubsztrát specifitása is sokkal szélesebb (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009).

Mindezen adatokból kiindulva munkánk első felében célul tűztük ki a *C. parapsilosis* fő szekretált aszpartil proteinázának, a Sapp1 fehérjének virulenciában betöltött szerepét. Előzetes Southern hibridizációs vizsgálataink során felmerült annak a lehetősége, hogy a *SAPPI* gén két kópiában van jelen a genomban, ezért a rendelkezésünkre álló szekvencia adatok felhasználásával elvégeztük a *SAPPI* lokusz *in silico* analízisét. Az analízis két identikus 2871bp méretű szekvenciát azonosított, egymástól 32kb távolságra, amely szakasz egy-egy kópiában tartalmazta a *SAPPI* gént, így a két kópiát *SAPPIa* és *SAPPIb* néven különítettünk el egymástól. Geraldine Butler és munkatársai 2009 végén publikálták a *C. parapsilosis* annotált genomszekvenciáját (Butler és mtsai. 2009), amely adatok megerősítették az *in silico* vizsgálat helyességét.

Annak érdekében, hogy a Sapp1 fehérje virulenciában betöltött szerepéről felvilágosítást nyerjünk, a *caSAT1* flipper rendszer segítségével elvégeztük a *SAPPIa* és *SAPPIb* gének delécióját, valamint sikerrel létrehoztunk egy Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b dupla deléciós törzset is. A *SAPPI* gének elvesztését RNS és fehérje szinten egyaránt megerősítettük, qRT-PCR, valamint a Sapp1 és Sapp2 fehérjék enzimaktivitásának vizsgálatára alkalmas HPLC vizsgálat során. A dupla deléciós törzs esetén sem RNS, sem enzim aktivitási szinten nem tudtunk kimutatni *SAPPI* génexpressziót, illetve Sapp1 fehérje aktivitást. Érdekes módon a dupla deléciós törzs esetén a vad típushoz képest emelkedett

mértékű *SAPP2* génexpressziót, valamint enzim aktivitás emelkedést tapasztaltunk. Ezen jelenség hátterében valószínűsíthetően egy visszacsatoló mechanizmus állhat, amely működésének eredményeként a *Sapp2* fehérje emelkedett termelését vagy a már megtermelt enzim aktivitásának fokozódását eredményezte, amely mintegy kompenzációs mechanizmus szolgál a *Sapp1* elvesztésére. Ez a jelenség felhívja a figyelmet arra, hogy akárcsak *C. albicans* esetén (Naglik és mtsai. 2003), *C. parapsilosis*-ban a szekretált aszpartil proteinázok kifejeződése szigorú szabályozás alatt áll. Ezen felül vizsgáltuk a putatív szekvenciaként számon tartott *SAPP3* gén transzkripciós változását is. A vad típus esetén, induktív körülmények között tízszeres transzkripciós növekedést tapasztaltunk, míg azon mutánsok esetén, melyek Δ/Δ *sapp1b* deléciót hordoztak, a *SAPP3* gén expressziója szignifikáns mértékben csökkent. További szekvencia analízis vizsgálatok kimutatták, hogy a *SAPP3* csupán minegy 500 bázispár távolságban helyezkedik el a *SAPP1b* lokuszhoz tartozó duplikálódott régiótól. Mivel a *SAPP1b* lokusz deléciója csupán a duplikálódott régió deléciójával volt kivitelezhető, így ezen deléció érinthette a *SAPP3* gén szabályozó régióját is.

C. albicans esetén régóta tudott, hogy a szekretált aszpartil proteinázok képesek a szérumban található számos komplement komponens bontására, ezáltal semlegesítve a gazda szervezet humorális védekezését (Gropp és mtsai. 2009). Annak kiderítésére, hogy a *Sapp1* fehérje rendelkezik-e hasonló szereppel elvégeztük a vad típusú és a különböző *Sapp1* mutáns törzsek szérumérzékenységének vizsgálatát. Eredményeink azt mutatták, hogy intakt humán szérum jelenlétében a vad típusú, és a Δ/Δ *sapp1a* és Δ/Δ *sapp1b* törzsek növekedése közt nem mutatkozott különbség, viszont a *SAPP1* deléciós mutáns törzs esetén a növekedés mértéke jelentős mértékben visszaesett. A kapott eredmény arra enged következtetni, hogy a *C. parapsilosis* *Sapp1* fehérjéjének, hasonlóan a *C. albicans* *Sap* fehérjéhez szerepe lehet a szérumban megtalálható komplement komponensek bontásában. A jelenség pontos okának kiderítése további biokémiai vizsgálatokat igényel tisztított *Sapp1* fehérje, valamint tisztított komplement komponensek és egyéb, szérumban található antimikrobiális peptidok (pl. defenzinek) bevonásával.

Egy fertőzés folyamatában a szervezetbe kerülő patogénekkal elsőként makrofágok kerülnek kapcsolatba. A szervezetbe jutott kórokozók felszínükön evolúciósan nagy mértékben konzervált motívumokat, patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) hordoznak, melyeket a makrofág sejtek mintázatfelismerő receptorokkal (PRR) ismernek fel. A felismerést követően lezajlik a mikroba fagocitózisa. A primer fagoszóma lizoszómával való fúziója pH csökkenéssel jár, melynek során megtörténik a patogén eliminációja (Netea és mtsai. 2008). Hogy ezen folyamatokat tanulmányozzuk, PBMC és PBMC-DM sejtek

felhasználásával *in vitro* fagocitózis vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálathoz a vad típusú, valamint a deléciós törzseket használtuk fel. Áramlási citometriás méréseink szerint a vad típushoz képest a *SAPPI* deléciós törzsek fagocitózisa jóval eredményesebben valósult meg. A fagocitózis folyamatának részletesebb tanulmányozása érdekében fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk PBMC-DM sejtek és vad típusú, valamint deléciós *C. parapsilosis* törzsek felhasználásával. A vad típussal fertőzött mintákhoz képest a Sapp1 fehérjét nem termelő mutáns törzzsel fertőzött PBMC-DM sejtek esetén emelkedett mértékű fago-lizoszóma fúziót figyeltünk meg. Ismeretes, hogy a fagoszóma lizoszómával történő fúziójához számos, a vezikulák felszínén található receptor-ligand kötődése szükséges (Fernandez-Arenas és mtsai. 2009). Az általunk végzett megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a Sapp1 fehérjének szerepe van a mikroba fagocita sejten belüli túlélésében is.

PBMC és PBMC-DM sejtek alkalmazásával vizsgáltuk a gazda sejtek vad típusú és deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képességét. Mind a PBMC, mind az ezekből differenciáltatott primer makrofágok esetén a dupla deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képesség szignifikáns emelkedést mutatott. Ezzel párhuzamosan a *SAPPI* deléciós törzs gazdasejtet károsító képessége csökkenést mutatott a vad típusú törzzsel összevetve.

Mindezen eredményeket összevetve eredményeink azt mutatják, hogy a Sapp1 fehérje jelentős szereppel bír a mikroba virulenciájának kialakításában. Szerepe van a gazda antimikrobiális peptidjeinek semlegesítésében, a fagocitózis gátlásában, valamint nagy mértékben hozzájárul a patogén fagocita sejten belüli túlélésében egyaránt.

7.2. A *C. parapsilosis* „Sapp negatív” szekretált aszpartil proteináz nem termelő mutáns törzsének virulencia vizsgálata.

C. albicans esetén tíz *SAP* gént azonosítottak (*SAP1-SAP10*), melyek egy géncsaládot alkotnak (Hube és Naglik 2001). Bár ezen organizmusban a *SAP* gének szerepe jól tanulmányozott, mégis egy teljes mértékben *SAP* deficiens törzs előállítása a gének nagy számából adódóan nem lehetséges. A *C. parapsilosis* genomjában mindösszesen két *SAPP* gén van jelen, amelyekről bizonyítottan aktív szekretált proteináz képződik, illetve egy feltételezhetően szekretált Sapp fehérjét kódoló gént azonosítottak, így ebben a fajban egy *SAPP* deficiens törzs előállítása, ezáltal egy olyan modellrendszer kialakítása, melyben a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött általános szerepe tanulmányozható, jóval eredményesebben megvalósítható feladat. Ezen cél elérése érdekében munkánk második

felében a $\Delta\Delta sappa1a-\Delta\Delta sappa1b$ törzset kiindulási törzsként alkalmazva, a *caSAT1* flipper rendszer segítségével elvégeztük a *SAPP2* gén delécióját.

A *SAPP2* gén delécióját Southern hibridizáción kívül ebben az esetben is megerősítettük mind transzkripciós szinten, mind enzim aktivitási szinten. A $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b-\Delta/\Delta sappa2$ törzs esetén sem *SAPP1*, sem *SAPP2* transzkripció nem volt detektálható, valamint a *SAPP3* gén transzkripciós szintje szignifikáns csökkenést mutatott. Ezen kívül a $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b-\Delta/\Delta sappa2$ törzs esetén nem detektáltuk sem a Sapp1, sem a Sapp2 fehérjékre jellemző enzimaktivitást. A létrehozott mutáns tehát mind expressziós mind enzimaktivitás tekintetében „Sapp negatív”-nak nevezhető.

Bár előző munkánk során létrehoztunk egy Sapp1 hiányos *C. parapsilosis* törzset, vizsgálni kívántuk ezen munka keretében, hogy a további szekretált aszpartil proteináz fehérjék elvesztésének van-e további hatása a mikroba humán szérumban mért növekedésére. Intakt humán szérum esetén a $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b-\Delta/\Delta sappa2$ mutáns törzs növekedése bár a vad típusú törzshöz képest szignifikáns csökkenést mutatott, összevetve az előző munkánk során mért *SAPP1* deléciós törzs szérumban mutatott növekedéssel, különbség nem volt megállapítható. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a Sapp1 fehérje az, amely hatékonyan képes semlegesíteni a gazda szervezet antimikrobiális peptidjeit. Ez a megfigyelés összhangban áll Olga Hruskova-Heidingsfeldova és munkatársai által kapott eredményekkel, miszerint a Sapp1 fehérje, összehasonlítva a Sapp2 fehérjével nem csak egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben termelődik, ám annak szubsztrát specificitása is jóval szélesebb (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009)

A gazda – patogén kölcsönhatás tanulmányozása érdekében jelen munka során szintén elvégeztük az *in vitro* makrofágokkal történő interakció vizsgálatát. A fagocitózis folyamatának tanulmányozásához áramlási citometriás módszert alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a Sapp negatív $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b-\Delta/\Delta sappa2$ törzset jóval nagyobb mértékben fagocitálják a gazda sejtek, mint a vad típusú törzset, ám összevetve ezen deléciós mutánst az előző munkánkban létrehozott *SAPP1* deléciós $\Delta/\Delta sappa1a-\Delta/\Delta sappa1b$ törzzsel a fagocitózis százalékában nem mutatkozik különbség, amely szintén arra utal, hogy a *C. parapsilosis* virulenciájában a szekretált aszpartil proteinázok közül a Sapp1 tölti be a legnagyobb szerepet. Pietrella és munkatársai kimutatták, hogy *C. albicans* esetén a Sap1, Sap2 és Sap6 megnöveli a primer monociták által termelt IL-1 β , TNF- α és IL-6 mennyiségét, továbbá a Sap3 szintén indukálja az IL-1 β és TNF- α termelését (Pietrella és mtsai. 2010) Hogy kiderítsük, vajon *C. parapsilosis* esetén a Sapp fehérjéknek van-e hasonló szerepe ELISA módszerrel mértük a fertőzés során termelődő proinflammatorikus citokinek (IL-1 β ,

TNF- α és IL-6) mennyiségét. A vad típushoz képest szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a Sapp negatív mutáns törzzsel fertőzött mintában, ám a Sapp fehérjék citokin válaszban betöltött szerepének tanulmányozásában ez csupán mint egy előzetes vizsgálat játszott szerepet. A Sapp fehérjék által indukált citokin termelés vizsgálatának alaposabb tanulmányozásához mindenképpen szükséges vizsgálni az anti-inflammatorikus citokinek mennyiségét is, valamint célszerű a kísérleti rendszert más sejtvonalakkal is bővíteni.

Vizsgáltuk továbbá a vad típusú és deléciós mutáns törzsek PBMC-DM sejtek általi ölési hatékonyságát. A Sapp negatív halmozottan deléciós mutáns törzs esetén a gazdasejtek általi gombaölési hatékonyság szignifikáns emelkedést mutatott. Összevetve az előző munkánkban tapasztalt Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b törzzsel szembeni ölési hatékonysággal, ebben az esetben a Sapp negatív törzzsel szembeni eliminációs hatékonyság további növekedést mutatott, amely azt bizonyítja, hogy a Sapp1 mellett további szekretált proteinázok is szereppel bírnak a mikroba makrofágon belüli túlélésében. Ez a megfigyelés összecseng a *C. albicans*-ban már leírt jelenséggel, miszerint a különböző Sap fehérjék a fertőzés térben és időben jól elkülöníthető fázisaiban játszanak fontos szerepet. Vizsgáltuk ezen felül a deléciós törzs gazdasejt károsító képességét is. A Sapp negatív törzs gazdasejtet károsító képessége a vad típuséhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott, ám összevetve az előző tanulmányban vizsgált Sapp1 deléciós mutáns törzzsel, a két deléciós törzs gazdasejt károsító képessége eltérést nem mutatott.

Galleria mellonella (Nagy viaszmol) lárvák felhasználásával *in vivo* túlélési vizsgálatot is elvégeztünk, ám a vad típusú törzzsel fertőzött és a deléciós törzzsel fertőzött egyedek túlélése között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

Bár a CUG kládba tartozó *Candida* fajok esetén yapszin típusú proteinek nem találunk (Naglik és mtsai. 2003), mégis *C. albicans* esetén a Sap9 és Sap10 fehérjékről ismert, hogy glikozil-foszfatidil-inozitol oldalláncot hordoznak, ezáltal a sejtfalba beépülni és a sejtfal integritását fenntartani képesek (Schild és mtsai. 2011). *C. parapsilosis* esetén, bár sem a Sapp1, sem a Sapp2 fehérje nem hordoz ilyen oldalláncot, a Sapp1 esetén kimutatták, hogy a fehérje képes a mikroba sejtfalában feldúsulni (Vinterova és mtsai. 2011). Ehhez kapcsolódóan, egy kollaborációs partnerünk, Prof. Olga Hruskova-Heidingsfeldova Sapp3 fehérjével végzett előzetes kutatási eredményei azt mutatják, hogy a Sapp3 fehérje ugyancsak képes a sejtfalban lokalizálódni (nem közölt adat, személyes megbeszélés). Mindezen adatok arra utalnak, hogy mind a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b, mind a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 deléciós törzs sejtfal összetétele különbözik a vad típusú törzsetől. Ezen okból elvégeztük a vad típusú, a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b valamint a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 deléciós

törzsek sejtfalösszetételének vizsgálatát. A vad típusú törzshöz képest a két deléciós mutáns törzs sejtfalösszetétele jelentős különbségeket mutatott. Mindkét deléciós törzs esetén a sejtfalban található kitin tartalom jelentősen lecsökkent, míg a glükán tartalom a $\Delta/\Delta sapp1a$ - $\Delta/\Delta sapp1b$ - $\Delta/\Delta sapp2$ törzs esetén többszöröse volt a vad típusú törzsének. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint ugyanezen deléciós törzs sejtfalának felszíne jóval kevesebb sejtfalkitüremkedést mutat, mint a vad típusú törzs.

Mindezen adatok alátámasztják a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázok sokrétű szerepét. Bár alapvető szerepük a peptidkötések hidrolízise, mégis vizsgálataink szerint ezen aszpartil proteinázok jelentős szereppel bírnak a mikroba virulenciájának kialakításában. Szerepük van a gazda szervezet szérumban található antimikrobiális fehérjéinek bontásában, a fagocitózis gátlásában, valamint a mikroba fagocita sejten belüli bontásában egyaránt. Másik fontos szerepük, amelyre vizsgálataink fényt derítettek a mikroba sejtfal összetételének szabályozásában áll. A sejtfal összetétel szekretált aszpartil proteinázok általi szabályozásának pontos mechanizmusa ezidáig nem ismert, így ezek további vizsgálatok tárgyát képezhetik a jövőben.

7.3. *C. parapsilosis* overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása.

A CUG kládba tartozó *Candida* fajok többsége diploid organizmus, melyek szexuális ciklussal nem rendelkeznek. Bár ezen fajok esetén számos géndeléciós módszert kidolgoztak (Noble és Johnson 2005, Gácsér és mtsai. 2007c), mégis egy adott gén deléciója sok esetben (pl. több kópiában jelen lévő gének esetén) hosszú időt vehet igénybe, valamint olyan gének esetén, melyek egy nagyobb géncsalád tagjai, a létrehozott deléciós mutáns esetében mérhető fenotipikus változás sok esetben nem jelentkezik annak következtében, hogy a géncsalád többi tagja képes átvenni a deletált gén szerepét. Ezen problémák áthidalására jelenthet megoldást a célzott gének túlműködtetése. *C. albicans* esetén számos gén overexpressziós rendszert kidolgoztak (Fu és mtsai. 2008, Jin és mtsai. 2008, Chauvel és mtsai. 2012). *C. parapsilosis* esetén gén overexpressziós rendszer ezidáig nem állt rendelkezésre, ezért munkánk ezen szakaszában célunk volt egy *C. parapsilosis*-ra optimalizált overexpressziós rendszer kidolgozása. Előzőleg Chauvel és munkatársai *C. albicans*-ban kidolgoztak egy jól működő rendszert, melynek segítségével rövid időn belül nagy számú gén túlműködtetése vált lehetségessé (Chauvel és mtsai. 2012). Ezen rendszer esetén a túlműködtetni kívánt gént, amely egy erős, konstitutív promoter szabályozása alatt áll, a *C. albicans* *RP10* régiójába juttatják be.

C. parapsilosis-on végzett munkánk első lépéseként a *C. albicans* *RP10* régióját, a pSFS2 vektor segítségével a *C. parapsilosis* CLIB 214 leucin auxotróf törzsének *RP10* régiójába integráltuk, melynek eredményeként a létrehozott törzsben lehetőség nyílik az előzőleg leírt overexpressziós rendszer adaptációjára. Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az így létrehozott törzs képes a majdani overexpressziós vektorok működtetésére, a Clp10-caTDH3-GFP vektor leucin auxotrófia markert hordozó változatát a létrehozott fogadó törzs *C. albicans* *RP10* régiójába integráltuk. Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálataink azt mutatták, hogy a transzformáns telepek minden sejtje GFP pozitív, így a konstitutív TDH3 promoter által működtetett gén ezen organizmus esetén is kifejeződik. Ezzel megbizonyosodhattunk arról, hogy a *C. parapsilosis*, hasonlóan a *C. albicans*-hoz képes a TDH3 promoter működtetésére, ezáltal a bejuttatott gén kifejeződése lehetségessé válik ezen fajban is.

Az overexpressziós vektorok rövid időn belüli létrehozásához az Invitrogen cég által kifejlesztett gateway klónozási rendszert alkalmaztuk. Ez a klónozási rendszer a hagyományos klónozással ellentétben a λ -fágból tisztított helyspecifikus rekombinázoikat: a BP és LR klonázokat használja. A helyspecifikus rekombinázoik alkalmazásával elkerülhető a hagyományos klónozási folyamat során alkalmazott restrikciós emésztési és ligálási lépés. A gateway rendszer alkalmazása során az első lépés az úgynevezett entry klón létrehozása. Ezen folyamat során a kívánt gén tulajdonképpen klónozó vektorba juttatása történik meg. A második lépésben zajlik le a destination vektor létrehozása. Felhasználástól függően a destination vektor sokféle lehet, így azt nem csak egy gén genomba történő integrációjára, hanem a képződő fehérje kifejeztetésére, tisztítására, riporter rendszerek létrehozásai is eredményesen lehet használni. Destination vektorként jelen munkában a pTDH3-GTW-LEU2 vektort használtuk. Az első, ilyen módon overexpresszáltatott gén a *WOR1* gén, amelynek *C. albicans* béli ortológjáról kimutatták, hogy a white-opaque átmenetben játszik fontos szerepet (Huang és mtsai. 2006). Az elkészített destination vektor *C. albicans* *RP10* régióját hordozó *C. parapsilosis* törzsbe történő sikeres transzformációját követően, a transzformánsok qRT-PCR vizsgálata a *WOR1* gén expressziójában bekövetkezett mintegy tízszeres overexpressziót mutattak. Ez az eredmény jól mutatja, hogy az alkalmazott rendszer eredményesen használható *C. parapsilosis* génektúlműködtetésére, ezáltal új utat nyit meg a mikroba génjeinek tanulmányozására. A rendszer előnye, hogy a deléciós módszerekkel összevetve jóval rövidebb idő alatt létrehozhatók az overexpressziós mutáns törzsek, így rövid időn belül nagy számú gén vizsgálata (akár a *C. parapsilosis* teljes ORF-om) válik lehetségessé. A TDH3 promoter egy erős, konstitutív promoter, amely nem induktív körülmények között is

magas szintű génexpressziót biztosít. Hátránya, hogy ezen promoter alkalmazásával bizonyos mutánsok letális fenotípust mutat(hat)nak. Ezen hátrány kiküszöbölése érdekében jövőbeli terveink közt szerepel a TDH3 promoter cseréje egy más, indukálható promoterre, amellyel ezen veszély elhárítható a rendszer alkalmazása során.

Munkánk eredményei új ismeretekkel bővítették a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteináz fehérjékkel kapcsolatos ismereteket, valamint sikeresen kidolgoztunk egy új, *C. parapsilosis*-ra optimalizált overexpressziós rendszer alapjait. A létrehozott deléciós mutánsok felhasználásával módunk nyílt a *SAPP* gén regulációjának vizsgálatára. *In vitro* fertőzőes rendszerben vizsgáltuk a Sapp1 fehérje virulenciában betöltött szerepének, továbbá egy Sapp negatív mutáns törzs létrehozásával és felhasználásával tanulmányozhattuk a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött általános szerepét. Kimutattuk, hogy a deléciós mutánsok csökkent virulenciával rendelkeznek. A Sapp fehérjék szerepet játszanak a mikroba humán szérumban való túlélése során, valamint fluoreszcens vizsgálatok során sikeresen kimutattuk, hogy ezen fehérjék jelentős szereppel bírnak a mikroba humán makrofág sejtekben való túlélésében a fagoszóma – lizoszóma fúzió gátlása által. A vad típusú és mutáns törzsek sejtfalösszetételének analízise kimutatta, hogy a Sapp fehérjéknek jelentős szerep jut a mikroba sejtfalának felépítésében. Munkánk során létrehoztunk egy olyan fogadó törzset, melynek segítségével ezen organizmusban is lehetséges egy overexpressziós stratégia alkalmazása, ezáltal egy új eszköztárral bővítettük a *C. parapsilosis* genetikai módosításának lehetőségeit.

8. SUMMARY

During the last three decades, candidiasis has become the most commonly diagnosed yeast-related infection worldwide. Although *Candida* species are members of the normal human flora, under specific circumstances they have the ability to turn themselves into pathogenic fungi causing superficial, cutaneous or systemic infections. In most cases *Candida* species are responsible for nosocomial infections. The major risk factors for opportunistic fungal infections are the prolonged hospitalization, the extended use of antibiotics, use of intravenous catheters and the low birth weight in case of premature neonates. According to recent studies, although the most prevalent species causing invasive candidiasis in adults is *C. albicans*, several studies demonstrated, that in special patient groups especially in case of neonates *C. parapsilosis* is even outmarks *C. albicans*. According to the genetic variability of *C. parapsilosis*, in 2005 the *C. parapsilosis* species complex was divided to three different species: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. These three groups form the *C. parapsilosis sensu lato* group. Although, in the last two decades candidial infections caused by non-*albicans* species show an increasing tendency, little is known about the pathomechanism and virulence attributes of these species. It has been shown, that secreted hydrolytic enzymes – especially lipases – play a crucial role in the pathogenicity and virulence of *C. parapsilosis*. Previous studies demonstrated, that *C. parapsilosis* lipase deficient strain has decreased virulence compared to the wild type in several *in vitro* and *in vivo* infection models. Even the two main secreted aspartyl proteinases of *C. parapsilosis* (Sapp1 and Sapp2) are biochemically well characterized, very little is known about the role of these enzymes during host-pathogen interactions. Although for *C. albicans* several techniques are available for genetic manipulation, the numbers of gene deletion methods in *C. parapsilosis* are limited and, there is no gene over-expression method available for this microbe.

The aims of our study were: 1.: to clarify the role of the *C. parapsilosis* secreted aspartyl proteinase 1 (Sapp1) in host-pathogen interactions, 2.: to generate a “Sapp negative” secreted aspartyl proteinase deficient strain in *C. parapsilosis* in order to study the general role of Sapp proteins in host-pathogen interactions, and finally 3.: to establish an overexpression strategy optimized for *C. parapsilosis*.

8.1. The role of secreted aspartyl proteinase 1 (Sapp1) in host-pathogen interactions.

The role of *C. albicans* secreted aspartyl proteinases, as virulence factors in host-pathogen interactions has been extensively investigated (Hube and Naglik 2001). It has been demonstrated, that *C. albicans* sap's are able to degrade several structural and immunologically important proteins of the host, thus assist the invasion of the microbe.

In contrast, the role of the two main proteinases (Sapp1 and Sapp2) (Hruskova-Heidingsfeldova, et al. 2009) of *C. parapsilosis* in virulence and pathogenesis was not studied previously. According to the biochemical studies, the major aspartyl proteinase of *C. parapsilosis* is the Sapp1 protein, thus we first focused on the investigation of Sapp1 in host-pathogen interactions.

The *in silico* analysis of *SAPPI* open reading frame using the sequence database of Sanger institute (www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis) revealed two, identical 2871bp long region in 32kb distance from each other in the *C. parapsilosis* genome, that contained the *SAPPI* ORF. The two copies of the ORF were identified as *SAPPIa* and *SAPPIb*. In 2009, Geraldine Butler and her colleagues submitted the annotated genome sequence of *C. parapsilosis*, that confirmed the result of our *in silico* analysis (Butler, et al. 2009).

In order to investigate the role of the *SAPPI* genes we applied the deletion constructs pSFS2Sapp1a and pSFS2Sapp1b and successfully generated *SAPPI* deletion mutants. Using the pSFS2Sapp1a construct a Δ/Δ sapp1a homozygous mutant was generated, while using the pSFS2Sapp1b construct – where we deleted the whole duplicated region - a Δ/Δ sapp1b homozygous mutant was generated. Further transformation steps made possible to generate a double deletion mutant where all *SAPPI* alleles were eliminated and a Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant strain was also successfully generated.

The loss of *SAPPI* alleles was validated in RNA and in protein level as well. Quantitative real-time PCR analysis was performed to measure the transcript levels of *SAPPI*, *SAPP2* and *SAPP3* (a putative secreted proteinase like ORF) genes. The wild type strain in proteinase inducing medium showed 80-fold overexpression of *SAPPI* while in the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b double deletion mutant no *SAPPI* transcription level was detectable. Interestingly, the *SAPP2* expression level was significantly increased in the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant in compare to the wild type under inductive conditions. The putative, yet not characterized gene the *SAPP3*, showed ten-fold overexpression in wild type yeast in

induction media. However, under the same conditions the homozygous Δ/Δ sapp1b strain displayed almost no *SAPP3* expression. To clarify this finding further sequence analyses were performed. The results indicate a possible deletion of the regulatory region of the *SAPP3* gene that was caused during the generation of the *SAPP1b* deficient mutant.

To investigate the enzyme activities of Sapp1 and Sapp2 proteins, quantitative HPLC measurement was performed using the fluorescent substrate DABCYL-Glu-His-Val-Lys-Leu-Val-Glu-EDANS. In the wild type strain both specific peaks of Sapp1 and Sapp2 were detected. Interestingly, the Sapp2 activity in the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant strain was significantly increased. Based on the elevated transcript and enzyme activity level of Sapp2 we assume a possible feedback mechanism that monitors the levels of the produced aspartyl proteinase levels. To prove this hypothesis further investigations are necessary. Importantly however, these results demonstrate a strict regulation of the proteinase production in *C. parapsilosis*. A similar regulatory mechanism has been described in *C. albicans* previously. (Naglik, et al. 2003).

It has been shown, that *C. albicans* Sap proteins are able to degrade the complement proteins of human serum (Gropp, et al. 2009) and enhance the dissemination of the microbe. To investigate whether the *C. parapsilosis* Sapp1 has similar role, serum susceptibility assay was performed. The presence of the heat inactivated human serum did not alter the growth capacity of the wild type nor the mutant cells. In contrast, the intact human serum inhibited the growth rate of the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant strain in compare to the wild type significantly. It suggests that *C. parapsilosis* Sapp1 is also able to inactivate some of the defense protein components (complement components, immunoglobulin, defensins etc.) of the human serum. To adequately clarify this result further biochemical studies are required by using purified complement components and *C. parapsilosis* Sapp1 protein.

Macrophages and other phagocytes play a crucial role in the host innate immune response. The pattern recognition receptors (PRRs) of macrophages are able to recognize the evolutionally conserved pathogen associated molecular patterns (PAMPs) of the pathogens. After the recognition, macrophages are able to phagocytose the invading pathogens. Following the phagocytosis, as a final step the phago-lysosome fusion takes place, that leads to the elimination of the ingested pathogen (Netea, et al. 2008).

To study the process of phagocytosis flow cytometry (FACS) and fluorescent microscopic analysis were performed. The phagocytic capacity of human macrophages (PBMC-DM) were investigated followed by the co-incubation of wild type and homozygous

deletion mutant cells. The results showed increased phagocytic capacity of PBMC-DM infected with the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant strain. To further dissect the process of engulfment, fluorescent microscopy analysis was performed. Increased phago-lysosome fusion was observed in macrophages infected with Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant strain in compare to the wild type. These results strongly suggest that Sapp1 has an important role in host-pathogen interaction, during the intracellular survival most likely due to the inhibition of phago-lysosome fusion.

To investigate the final stage of host-pathogen interaction killing assays were performed. Using PBMC and PBMC-DM cells the killing efficiency was monitored after the co-incubation of host cells with wild-type and *SAPP1* homozygous mutant strains. Both the PBMC, and PBMC-DM showed significantly increased elimination efficiency against the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant cells. Additionally, the damage of the host cells caused by Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant strain was significantly decreased compared to the damage caused by the wild-type strain. These results suggest that *C. parapsilosis* Sapp1 has an important role in the maintenance of virulence by inhibiting the intracellular killing efficiency of host cells and by propagating the intracellular survival.

All these data demonstrate that Sapp1 is an important virulence factor of *C. parapsilosis*. Sapp1 is able to degrade host defense proteins, inhibits the phagocytosis, phago-lysosome fusion and promotes the intracellular survival of the pathogen.

8.2. The general role of *C. parapsilosis* secreted proteinases in virulence and host-pathogen interactions.

The *C. albicans* secreted aspartyl proteinase gene family consists of ten *SAP* genes (*SAP1-SAP10*), that are well characterized (Hube and Naglik 2001, Naglik, et al. 2003), however the generation of a *SAP* deficient strain in *C. albicans* due to the high number of encoding genes is almost impossible. *C. parapsilosis* has only three *SAPP* genes (*SAPP1-SAPP3*), where *SAPP1* and *SAPP2* are actively transcribed, while *SAPP3* is considered as a pseudogene. For this reason, the generation of a *C. parapsilosis* *SAPP* deficient strain is much feasible. Our second aim was to investigate the general role of *C. parapsilosis* Sapps during host-pathogen interactions by generating a *SAPP* minus strain.

We validated the loss of *SAPP2* in transcriptional level by Quantitative Real-Time PCR in inductive (1x YCB+ 2% BSA) and non inductive (YPD) conditions. In the deletion

mutant strain neither *SAPP1*, nor *SAPP2* mRNA was detectable. The transcriptional level of *SAPP3* was also significantly decreased.

To measure the activities of Sapp1 and Sapp2 enzymes the concentrated supernatants of the wild-type, Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b and the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 strains were applied. The Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 strain showed no proteinase activity, which also validated the loss of *SAPP1* and *SAPP2* genes.

Our previous results suggested, that *C. parapsilosis* Sapp1 plays an important role by digesting the serum proteins. To investigate, whether the loss of Sapp2 has similar effect, serum susceptibility assay was performed. In intact human serum the growth of the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 strain was significantly decreased after 24 and 48 hours of cultivation. Compared to our previous result, there was no difference between the growth rate of Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b and Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 strains in human serum, suggesting that only Sapp1 has the role in the degradation of the host immune proteins of the human serum.

Similarly, there was no difference in the ratio of phagocytosis by macrophages between Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b and Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 strains. This result suggests, that Sapp1 has the major role in the inhibition of phagocytosis.

It has been shown, that *C. albicans* Sap1, Sap2 and Sap6 proteins are able to induce the secretion of IL-1 β , IL-6, TNF- α and additionally, Sap3 is able to induce the production of IL-1 β and TNF- α (Pietrella, et al. 2010). To investigate whether *C. parapsilosis* Sapp proteins can also modulate the host response, the level of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) produced by PBMC-DM were measured. Although, the infection of the macrophages with Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 cells resulted in a decreased level of IL-1 β and IL-6 production, these differences were not significant in compare to the wild type infection. Importantly, we still can not exclude the potential immune modulatory role of the *C. parapsilosis* Sapps, however this need further investigations, using different cell lines and by measuring the anti-inflammatory cytokines as well.

The killing efficiency of the human macrophages was also measured after the coincubation with the Sapp minus deletion strain. We detected a slight increase in the killing efficiency against Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b- Δ/Δ sapp2 cells compared to the Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b mutant, suggesting that Sapp2 could have an additive effect in the intracellular survival of the microbe.

To analyse the *in vivo* effect of the secreted proteinases, a non-conventional animal model (*Galleria mellonella* larvae) was applied. The survival of *G. mellonella* larvae infected with wild-type and $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ strains were monitored for 14 days after infection, however no significant differences could be observed between the survivals of the infected larvae.

Previous studies indicated, that *C. albicans* Sap9 and Sap10 proteins are GPI anchored and localized in the fungal cell wall. Additionally, they have an important role in the maintenance of cell wall integrity of *C. albicans* (Schild, et al. 2011). Therefore, we analysed the cell wall composition of wild-type, $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ and $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ strains. Notably, the chitin content of the cell wall was decreased in both deletion mutant, while the glucan content of the $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ cells showed elevated level. Scanning electron microscopy demonstrated that the cell wall surface of the $\Delta/\Delta\text{sapp1a-}\Delta/\Delta\text{sapp1b-}\Delta/\Delta\text{sapp2}$ strain is smoother, compared to wild-type strain. These data demonstrate, that *C. parapsilosis* secreted aspartyl proteinases are not only important virulence factors, but also play a crucial role in the cell wall maintenance.

In summary, *C. parapsilosis* secreted aspartyl proteinases are important factors for the virulence and pathogenesis. They have a major role in the neutralization of immune proteins of the host, inhibition of phagocytosis and they can promote the intracellular survival of the pathogen. Additionally, *C. parapsilosis* secreted aspartyl proteinases may contribute to the maintenance of the cell wall integrity.

8.3. Development of an overexpression strategy for *C. parapsilosis*

Members of the CUG clade are constitutively diploid and lack the sexual cycle. For this reason, in these species, gene deletion process is time intensive and technically challenging. Furthermore, the gene deletion methods are not suitable to investigate the role of essential genes. To bypass this problem and to adequately study a function of a gene of interest, a possible solution is to overexpress the targeted gene. Although in case of *C. albicans* many overexpression systems are available (Fu, et al. 2008, Jin, et al. 2008, Chauvel, et al. 2012), no such strategy is available in *C. parapsilosis*. Thus, our aim was to develop a new overexpression system for *C. parapsilosis*.

First, we generated a *C. parapsilosis* acceptor strain, that is able to overexpress our gene of interest. Using the *caSAT1* flipper system, the *RPS10* locus of *C. albicans* was

integrated into the locus of the *RPS10* locus of the *C. parapsilosis* CLIB 214 leucine auxotrophic strain.

To investigate, that the generated strain is able to overexpress the gene of interest, a TDH3-GFP containing plasmid was transformed into the acceptor strain. The TDH3 promoter is a strong, constitutive promoter, which allows the active transcription of the GFP reporter gene. Fluorescent microscopic studies revealed, that the transformants are GFP positive, demonstrating that the acceptor strain is suitable for overexpression.

To generate the vectors for overexpression, the Gateway cloning strategy was applied.

As a proof of principle, we selected the *WOR1* gene for overexpression. The orthologous of this gene in *C. albicans* is responsible for white-opaque transition and regulates sexual cycles. The *WOR1* containing destination vector was transformed to the *C. parapsilosis* acceptor strain. After transformation the gene expression level of *WOR1* were monitored by qRT-PCR and resulted a more than 10 fold overexpression in the transformants.

In summary, we successfully generated an overexpression system for *C. parapsilosis*, using the highly efficient Gateway cloning system. This strategy will facilitate the development of overexpression libraries and will definitely help to understand the molecular basis of the pathogenesis and virulence of the important human fungal pathogen, *C. parapsilosis*.

The results of our work provided new insights in the pathomechanisms of *C. parapsilosis*, especially regarding the role of the secreted aspartyl proteinases as virulence factors. Using the generated *SAPP* mutant strains we investigated the different functions of *C. parapsilosis* secreted proteinases in several *in vitro* infection models. Our results demonstrate that *SAPP1* and also the *SAPP* deficient *C. parapsilosis* strain display decreased virulence. Sapp proteins play an important role in the survival capacity of the microbe in human serum. Sapps also have a major role in the inhibition of phagocytosis and facilitate the intracellular survival of the pathogen by the inhibiting the phagosome-lysosome fusion. The analysis of the cell wall composition suggests that Sapp proteins may have an important role in the maintenance of the cell wall. Additionally, we successfully established a new overexpression strategy optimized to *C. parapsilosis*. This overexpression method provides a new tool for the genetic modification of *C. parapsilosis*.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Stewart K, Navaza J, Payne CD, Ray TL. (1996) Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. *Protein Sci* 5(4):640-52.

Agatensi L, Franchi F, Mondello F, Bevilacqua RL, Ceddia T, De Bernardis F, Cassone A. (1991) Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. *J Clin Pathol* 44(10):826-30.

Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schäfer W, Klis F, Monod M, Hube B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 281(2):688-94.

Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodríguez-Tudela JL, Pahissa A. (2006) Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 44(5):1681-5.

Anderson J, R. Mihalik, D. R. Soll (1990) Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *J Bacteriol* 172(1):224-35.

Ash J, Dominguez M, Bergeron JJ, Thomas DY, Bourbonnais Y. (1995) The yeast proprotein convertase encoded by YAP3 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J Biol Chem* 270(35):20847-54.

Barelle C. J., Manson CL, MacCallum DM, Odds FC, Gow NA, Brown AJ. (2004) GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast* 21(4):333-40.

Barrett-Bee, K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 131(5):1217-21.

Barrett, A. J. (1979) Protein degradation in health and disease. Introduction: the classification of proteinases. *Ciba Found Symp* (75):1-13.

Barrett, A. J., N. D. Rawlings (1991) Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans* 19(3):707-15.

Basso, L. R., Jr., Bartiss A, Mao Y, Gast CE, Coelho PS, Snyder M, Wong B. (2010) Transformation of *Candida albicans* with a synthetic hygromycin B resistance gene. *Yeast* 27(12):1039-48.

Beausejour, A., Grenier D, Goulet JP, Deslauriers N. (1998) Proteolytic activation of the interleukin-1 β precursor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 66(2):676-81.

Borg-von Zepelin, M., Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M. (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* 28(3):543-54.

Brockerhoff, H. (1974) Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. *Lipids* 9(9):645-50.

Brunel, L., Neugnot V, Landucci L, Boze H, Moulin G, Bigey F, Dubreucq E. (2004) High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 111(1):41-50.

Buffo, J., M. A. Herman, D. R. Soll (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85(1-2):21-30.

Butler, G., Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA. (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459(7247):657-62.

Cabral, V., Chauvel M, Firon A, Legrand M, Nesseir A, Bachellier-Bassi S, Chaudhari Y, Munro CA, d'Enfert C. (2012) Modular gene over-expression strategies for *Candida albicans*. *Methods Mol Biol* 845:227-44.

Cassone, A., De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. (1999) In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 180(2):448-53.

Chauvel, M., Nesseir A, Cabral V, Znaidi S, Goyard S, Bachellier-Bassi S, Firon A, Legrand M, Diogo D, Naulleau C, Rossignol T, d'Enfert C. (2012) A versatile overexpression strategy in the pathogenic yeast *Candida albicans*: identification of regulators of morphogenesis and fitness. *PLoS One* 7(9):e45912.

Chow, B. D., J. R. Linden, J. M. Bliss (2012) *Candida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10(8):935-46.

Colina, A. R., Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, de Repentigny L. (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 64(11):4514-9.

Connolly, L. A., Riccombeni A, Grózer Z, Holland LM, Lynch DB, Andes DR, Gácsér A, Butler G. (2013) The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *Mol Microbiol* 90(1):36-53.

Dagdeviren, M., N. Cerikcioglu, M. Karavus (2005) Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 48(5):321-6.

Davies, D. R. (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem* 19:189-215.

De Bernardis, F., Agatensi L, Ross IK, Emerson GW, Lorenzini R, Sullivan PA, Cassone A. (1990) Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 161(6):1276-83.

De Bernardis, F., Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schäfer W, Cassone A. (1999) Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* 179(1):201-8.

De Bernardis, F., Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, Sullivan PA, Cassone A. (1996) Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 64(2):466-71.

Dias, J. C., Rezende RP, Rosa CA, Lachance MA, Linardi VR. (2000) Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. *Can J Microbiol* 46(6):525-31.

Ding, C., Butler G. (2007) Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 6(8):1310-9.

Dmytruk, K. V., Yatsyshyn VY, Sybirna NO, Fedorovych DV, Sibirny AA. (2011) Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production. *Metab Eng* 13(1):82-8.

Dostal, J., Brynda J, Hrusková-Heidingsfeldová O, Siegllová I, Pichová I, Rezáčová P. (2009) The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A. *J Struct Biol* 167(2):145-52.

Dostal, J., Dlouhá H, Malon P, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová O. (2005) The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol Chem* 386(8):791-9.

Drobacheff, C., Millon L, Monod M, Piarroux R, Robinet E, Laurent R, Meillet D. (2001) Increased serum and salivary immunoglobulins against *Candida albicans* in HIV-infected patients with oral candidiasis. *Clin Chem Lab Med* 39(6):519-26.

Fallon, K., Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P. (1997) Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* 65(2):551-6.

Felk, A., Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B. (2002) *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* 70(7):3689-700.

Fernanado, P. H., Panagoda G. J., L. P. Samaranayake (1999) The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS* 107(11):1034-42.

Fernandez-Arenas, E., Bleck CK, Nombela C, Gil C, Griffiths G, Diez-Orejas R. (2009) *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol* 11(4):560-89.

Filippidi, A., Galanakis E, Maraki S, Galani I, Drogari-Apiranthitou M, Kalmanti M, Mantadakis E, Samonis G. (2014) The effect of maternal flora on *Candida* colonisation in the neonate. *Mycoses* 57(1):43-8.

Filler, S. G., Ibe BO, Luckett PM, Raj JU, Edwards JE Jr. (1991) *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. *J Infect Dis* 164(5):928-35.

Fonzi, W. A., M. Y. Irwin (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134(3):717-28.

Fu, Y., Luo G, Spellberg BJ, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. (2008) Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 7(3):483-92.

Gacser, A., S. Salomon, W. Schäfer (2005) Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* 245(1):117-21.

Gacser, A., Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. (2007a) Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 44(12):1336-41.

Gacser, A., Stehr F, Kröger C, Kredics L, Schäfer W, Nosanchuk JD. (2007b) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* 75(10):4710-8.

Gacser, A., Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. (2007c) Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117(10):3049-58.

Gagnon-Arsenault, I., J. Tremblay, Y. Bourbonnais (2006) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Res* 6(7):966-78.

Ghannoum, M. A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13(1):122-43, table of contents.

Ghannoum, M., K. Abu Elteen (1986) Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 24(5):407-13.

Gossen, M., A. L. Bonin, H. Bujard (1993) Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem Sci* 18(12):471-5.

Gow, N. A., van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10(2):112-22.

Gropp, K., Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. (2009) The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol* 47(2-3):465-75.

Hara, A., Arie M, Kanai T, Matsui T, Matsuda H, Furuhashi K, Ueda M, Tanaka A. (2001) Novel and convenient methods for *Candida tropicalis* gene disruption using a mutated hygromycin B resistance gene. *Arch Microbiol* 176(5):364-9.

Hartley, J. L., Temple G. F., M. A. Brasch (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11):1788-95.

Hruskova-Heidingsfeldova, O. (2008) Secreted proteins of *Candida albicans*. *Front Biosci* 13:7227-42.

Hruskova-Heidingsfeldova, O., Dostál J, Majer F, Havlíková J, Hradilek M, Pichová I. (2009) Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem* 390(3):259-68.

Huang, G., Wang H, Chou S, Nie X, Chen J, Liu H. (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(34):12813-8.

Hube, B. (1998) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15(2):65-8.

Hube, B., J. Naglik (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147(Pt 8):1997-2005.

Hube, B., Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* 174(5):362-74.

Jacobsen, I. D. (2014) *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* 5(2):237-9.

Jayatilake, J. A., Y. H. Samaranayake, L. P. Samaranayake (2005) An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 34(4):240-6.

Jin, R., Dobry CJ, McCown PJ, Kumar A. (2008) Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol Biol Cell* 19(1):284-96.

Kakar, S. N., P. T. Magee (1982) Genetic analysis of *Candida albicans*: identification of different isoleucine-valine, methionine, and arginine alleles by complementation. *J Bacteriol* 151(3):1247-52.

Kantarcioglu, A. S., A. Yucel (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45(5-6):160-5.

Kaur, R., B. Ma, B. P. Cormack (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18):7628-33.

Kilian, M., J. Mestecky, M. W. Russell (1988) Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* 52(2):296-303.

Kim, S. K., K. El Bissati, C. Ben Mamoun (2006) Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 152(Pt 10):2885-94.

Kohler, G. A., T. C. White, N. Agabian (1997) Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* 179(7):2331-8.

Komano, H., R. S. Fuller (1995) Shared functions in vivo of a glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23):10752-6.

Korting, H. C., Schaller M, Eder G, Hamm G, Böhmer U, Hube B. (1999) Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43(8):2038-42.

Kosa, P., B. Gavenciakova, J. Nosek (2007) Development of a set of plasmid vectors for genetic manipulations of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Gene* 396(2):338-45.

Kovac, L., J. Lazowska, P. P. Slonimski (1984) A yeast with linear molecules of mitochondrial DNA. *Mol Gen Genet* 197(3):420-4.

Kretschmar, M., Hube B, Bertsch T, Sanglard D, Merker R, Schröder M, Hof H, Nichterlein T. (1999) Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* 67(12):6637-42.

Kreusch, A., A. S. Karstaedt (2013) Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis* 17(8):e621-3.

Krysan, D. J., Ting EL, Abeijon C, Kroos L, Fuller RS. (2005) Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4(8):1364-74.

Laffey, S. F., G. Butler (2005) Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151(Pt 4):1073-81.

Lipke, P. N., R. Ovalle (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* 180(15):3735-40.

Macdonald, F., F. C. Odds (1980) Purified *Candida albicans* proteinase in the serological diagnosis of systemic candidosis. *JAMA* 243(23):2409-11.

- Macdonald, F., F. C. Odds (1983) Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 129(2):431-8.
- Mardon, D., E. Balish, A. W. Phillips (1969) Control of dimorphism in a biochemical variant of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 100(2):701-7.
- Merkerova, M., Dostál J, Hradilek M, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová O. (2006) Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res* 6(7):1018-26.
- Millerioux, Y., Clastre M, Simkin AJ, Courdavault V, Marais E, Sibirny AA, Noël T, Crèche J, Giglioli-Guivarc'h N, Papon N. (2011) Drug-resistant cassettes for the efficient transformation of *Candida guilliermondii* wild-type strains. *FEMS Yeast Res* 11(6):457-63.
- Monod, M., Togni G, Hube B, Sanglard D. (1994) Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13(2):357-68.
- Moran, C., Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK Jr, Reed SD. (2009) *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* 28(5):433-5.
- Morrow, B., H. Ramsey, D. R. Soll (1994) Regulation of phase-specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A. *J Med Vet Mycol* 32(4):287-94.
- Morrow, B., Srikantha T, Anderson J, Soll DR. (1993) Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun* 61(5):1823-8.
- Morschhauser, J., S. Michel, P. Staib (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* 32(3):547-56.
- Morschhauser, J., P. Staib, G. Kohler (2005) Targeted gene deletion in *Candida albicans* wild-type strains by MPAR flipping. *Methods Mol Med* 118:35-44.
- Morschhauser, J., Virkola R, Korhonen TK, Hacker J. (1997) Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 153(2):349-55.
- Murad, A. M., Lee PR, Broadbent ID, Barelle CJ, Brown AJ. (2000) Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast* 16(4):325-7.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe, B. Hube (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3):400-28.
- Nakayama, H., Mio T, Nagahashi S, Kokado M, Arisawa M, Aoki Y. (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* 68(12):6712-9.
- Netea, M. G., Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6(1):67-78.

Neu, N., Malik M, Lunding A, Whittier S, Alba L, Kubin C, Saiman L.(2009) Epidemiology of candidemia at a Children's hospital, 2002 to 2006. *Pediatr Infect Dis J* 28(9):806-9.

Nguyen, L. N., Hamari Z, Kadereit B, Trofa D, Agovino M, Martinez LR, Gacser A, Silver DL, Nosanchuk JD. (2011) Candida parapsilosis fat storage-inducing transmembrane (FIT) protein 2 regulates lipid droplet formation and impacts virulence. *Microbes Infect* 13(7):663-72.

Nguyen, L. N., J. D. Nosanchuk (2011) Lipid droplet formation protects against gluco/lipotoxicity in Candida parapsilosis: an essential role of fatty acid desaturase Ole1. *Cell Cycle* 10(18):3159-67.

Nguyen, L. N., D. Trofa, J. D. Nosanchuk (2009) Fatty acid synthase impacts the pathobiology of Candida parapsilosis in vitro and during mammalian infection. *PLoS One* 4(12):e8421.

Noble, S. M., A. D. Johnson (2005) Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen Candida albicans. *Eukaryot Cell* 4(2):298-309.

Noble, S. M., A. D. Johnson (2007) Genetics of Candida albicans, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet* 41:193-211.

Nosek, J., Dinouël N, Kovac L, Fukuhara H. (1995) Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Mol Gen Genet* 247(1):61-72.

Nucci, M., Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarria JI, Colombo AL; Latin American Invasive Mycosis Network. (2013) Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* 8(3):e59373.

Pammi, M., Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. (2013) Candida parapsilosis is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 32(5):e206-16.

Panagoda, G. J., A. N. Ellepola, L. P. Samaranayake (2001) Adhesion of Candida parapsilosis to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 44(1-2):29-35.

Papon, N., Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. (2013) Emerging and emerged pathogenic Candida species: beyond the Candida albicans paradigm. *PLoS Pathog* 9(9):e1003550.

Papon, N., Courdavault V, Clastre M, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-Guivarc'h N. (2012) Deus ex Candida genetics: overcoming the hurdles for the development of a molecular toolbox in the CTG clade. *Microbiology* 158(Pt 3):585-600.

Pappas, P. G., Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. (2003) A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 37(5):634-43.

Park, Y. N., J. Morschhauser (2005) Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4(8):1328-42.

Parm, U., Metsvaht T, Sepp E, Ilmoja ML, Pisarev H, Pauskar M, Lutsar I. (2011) Risk factors associated with gut and nasopharyngeal colonization by common Gram-negative species and yeasts in neonatal intensive care units patients. *Early Hum Dev* 87(6):391-9.

Pereira, E., Figueira C, Aguiar N, Vasconcelos R, Vasconcelos S, Calado G, Brandão J, Prada S. (2013) Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Sci Total Environ* 461-462:469-79.

Pfaller, M. A., D. J. Diekema (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20(1):133-63.

Pfaller, M. A., Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E; Global Antifungal Surveillance Study. (2007) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 45(6):1735-45.

Pichova, I., Pavlícková L, Dostál J, Dolejší E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M. (2001) Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 268(9):2669-77.

Pietrella, D., Rachini A, Pandey N, Schild L, Netea M, Bistoni F, Hube B, Vecchiarelli A. (2010) The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun* 78(11):4754-62.

Pryszcz, L. P., Németh T, Gácsér A, Gabaldón T. (2013) Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol* 5(12):2382-92.

Pugh, D., R. A. Cawson (1977) The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* 15(1):29-35.

Reuss, O., Vik A, Kolter R, Morschhäuser J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341:119-27.

Roemer, T., Jiang B, Davison J, Ketela T, Veillette K, Breton A, Tandia F, Linteau A, Sillaots S, Marta C, Martel N, Veronneau S, Lemieux S, Kauffman S, Becker J, Storms R, Boone C, Bussey H. (2003) Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol* 50(1):167-81.

Ruchel, R. (1986) Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci* 3(10):316-9.

Sahni, N., Yi S, Daniels KJ, Huang G, Srikantha T, Soll DR. (2010) Tec1 mediates the pheromone response of the white phenotype of *Candida albicans*: insights into the evolution of new signal transduction pathways. *PLoS Biol* 8(5):e1000363.

Samaranayake, D. P., S. D. Hanes (2011) Milestones in *Candida albicans* gene manipulation. *Fungal Genet Biol* 48(9):858-65.

Schaller, M., Borelli C, Korting HC, Hube B. (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48(6):365-77.

Schaller, M., Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen W, Hube B. (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 34(1):169-80.

Schild, L., Heyken A, de Groot PW, Hiller E, Mock M, de Koster C, Horn U, Rupp S, Hube B. (2011) Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot Cell* 10(1):98-109.

Schroppel, K., Sprösser K, Whiteway M, Thomas DY, Röllinghoff M, Csank C. (2000) Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun* 68(12):7159-61.

Schweizer, A., Rupp S, Taylor BN, Röllinghoff M, Schröppel K. (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 38(3):435-45.

Seider, K., Heyken A, Lüttich A, Miramón P, Hube B. (2010) Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol* 13(4):392-400.

Silva, S., Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper SJ, Williams DW. (2009) Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci* 117(6):669-75.

Soll, D. R. (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 5(2):183-203.

Staib, P., Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J. (2000) Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):6102-7.

Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J. (2002) Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection. *Infect Immun* 70(2):921-7.

Stehr, F., Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, Hube B, Schäfer W. (2004) Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 4(4-5):401-8.

- Strauss, A., S. Michel, J. Morschhauser (2001) Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183(12):3761-9.
- Tang, S. J., Sun KH, Sun GH, Chang TY, Wu WL, Lee GC. (2003) A transformation system for the nonuniversal CUG(Ser) codon usage species *Candida rugosa*. *J Microbiol Methods* 52(2):231-8.
- Tavanti, A., Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43(1):284-92.
- Tortorano, A. M., Prigitano A, Lazzarini C, Passera M, Deiana ML, Cavinato S, De Luca C, Grancini A, Lo Cascio G, Ossi C, Sala E, Montagna MT. (2013) A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection* 41(3):655-62.
- Trofa, D., A. Gacser, J. D. Nosanchuk (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21(4):606-25.
- Urlinger, S., Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14):7963-8.
- Valach, M., Pryszcz LP, Tomaska L, Gacser A, Gabaldón T, Nosek J. (2012) Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex. *Mitochondrion* 12(5):514-9.
- Vilanova, M., Teixeira L, Caramalho I, Torrado E, Marques A, Madureira P, Ribeiro A, Ferreira P, Gama M, Demengeot J. (2004) Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunology* 111(3):334-42.
- Vinterova, Z., Sanda M, Dostál J, Hrušková-Heidingsfeldová O, Pichová I. (2011) Evidence for the presence of proteolytically active secreted aspartic proteinase 1 of *Candida parapsilosis* in the cell wall. *Protein Sci* 20(12):2004-12.
- Weems, J. J., Jr. (1992) *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 14(3):756-66.
- Wilson, R. B., D. Davis, A. P. Mitchell (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* 181(6):1868-74.
- Yang, Y. L., Chen HF, Kuo TJ, Lin CY. (2006) Mutations on CaENO1 in *Candida albicans* inhibit cell growth in the presence of glucose. *J Biomed Sci* 13(3):313-21.
- Zaugg, C., Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. (2001) Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 69(1):405-12.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvolgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy támogatta munkámat és lehetőséget adott, hogy doktori értekezésemet elkészíthessem.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Gácsér Attila tudományos főmunkatársnak, hogy magas színvonalú kutatómunkában vehettem részt. Köszönöm továbbá irányadó tanácsait, segítségét és hogy a változatos kutatási témák révén számos gyakorlati technikával és eljárással gazdagodhatott a tudásom.

Köszönettel tartozom Dr. Olga Hrusková-Heidingsfeldová-nak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a szekretált aszpartil proteinázok kimutatására alkalmas fluoreszcens szubsztrátot, valamint a tisztított Sapp1 fehérjét.

Köszönöm Bencsik Ottónak a HPLC vizsgálatban és analízisben nyújtott segítségét.

Köszönet illeti továbbá valamennyi kollaborációs partnerünket, így Joshua D. Nosanchuk-ot értékes tanácsaiért és a publikációink előzetes minősítéséért, Oscar Zaragoza-t a fagoszóma – lizoszóma kolokalizációs vizsgálatban nyújtott segítségével, valamint Leonardo Nimrichter-t a sejtfalösszetétel vizsgálatban nyújtott segítségével.

Köszönöm minden kollégámnak: Csonka Katalinnak, Grózer Zsuzsannának, Szenzenstein Juditnak, Tóth Adélnek, Tóth Renátának, Németh Tibornak, Papp Csabának, Luis Antonio Pérez García-nak és Tanmoy Chakraborty-nak; MSC hallgatóinknak Papp Henriettának, Riba Adriennek, BSC hallgatóinknak Bernátsky Reginának, Berta Bálintnak, Molnár Gergőnek segítségüket és a labor kellemes légkörét.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek, nővéremnek és páromnak, Geltsch Nikolettának, hogy a doktori munkám alatt támogattak és mellettem álltak.